ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.64 No.3 2015

專題論述

167 穀胱甘肽與水稻環境逆境
高景輝

研究報告

177 地黃無菌播種及微體繁殖研究
曹進義、陳威臣、吳姿穎、夏奇鈮

189 熱泵冷凝乾燥應用研究
黃禮棟、林建志、邱相文、蔡致榮

196 香菇微波冷凝乾燥系統研究
黃禮棟、林建志、邱相文

204 使用即時定量RT-PCR於瓜類褪綠黃化病毒檢驗之評估
關政平、林育昌、曾清山、鄭櫻慧、鄧汀欽

213 應用重要-表現程度分析於農業試驗所解說媒體之成效評估
蕭淑芬、謝雨蒔、陳烈夫

228 未經冷馴化之草莓腋芽超低溫冷凍保存研究
蕭翌柱、陳冠文

研究簡報

239 台灣危害木瓜的新興害蟎
何琦琛、王順成、黃詩媖、石憲宗

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／台灣大學農藝學系
陳世銘／台灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃振文／中興大學植物病理學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／台灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

李妙君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

台灣農業研究

第六十四卷　第三期　　中華民國一〇四年九月三十日

出版者	行政院農業委員會農業試驗所
發行人	陳駿季
總編輯	楊純明
地址	41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址	http://www.tari.gov.tw
電話	(04)2331-7236
E-mail	jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統	http://aspers.airiti.com/JTAR
編印	Airiti Press Inc.
地址	23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話	(02)2926-6006
E-mail	press@airiti.com
定價	新台幣一七五元
展售門市	1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02) 2518-0207 國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw 2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):167–176 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.01

Review Article

Role of Glutathione in Abiotic Stress Tolerance of Rice Plants

Ching Huei Kao[1,*]

Abstract

Kao, C. H. 2015. Role of glutathione in abiotic stress tolerance of rice plants. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):167–176.

Glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), and glutathione peroxidase (GPX) are important components of scavenging system for reactive oxygen species in plants. The importance of glutathione and its related enzymes in rice plants in response to abiotic stresses is reviewed. Evidence is provided to show that GSH plays critical role in tolerance to chilling, salinity, copper and cadmium excess, and herbicide treatment.

Key words: Glutathione, Glutathione peroxidase, Glutathione reductase, Glutathione S-transferase, Rice.

INTRODUCTION

It is well established that reactive oxygen specie (ROS) such as superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (•OH) are produced during normal aerobic metabolism. ROS are produced in different cell components such as cell walls, plasma membrane, chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes (Dat *et al.* 2000). Basically, these oxygen species are highly reactive causing damage to proteins lipids, DNA, and ultimate result in cell death (Foyer & Noctor 2005). The intensity of the ROS production is determined by interplay between the ROS production and ROS scavenging capacity of the cell. During unfavorable conditions such as drought, low temperature, salinity, and heavy metals, ROS production exceeds the scavenging capacity of the cell. An overproduction of ROS results in oxidative damage (Fridovich 1986). To prevent the oxidative damage, plants have developed enzymatic and non-enzymatic systems for scavenging ROS (Dat *et al.* 2000). Plants use non-enzymatic components, such as ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH), and antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR), to scavenge ROS (Noctor & Foyer 1998). Compared with Arabidopsis and tobacco, the role of GSH in rice plants is less well known. In this review, we discuss the most recently published data concerning the role of GSH in rice plants under conditions of chilling, salinity, copper (Cu) and cadmium (Cd) excess, and herbicide treatment.

GLUTATHIONE

The tripeptide glutathione (GSH; γ-glutamate-cysteine-glycine) is sulfur containing non-protein thiol. Reactivity of GSH depends on the thiol group (-SH). It can act as an effective electron acceptor and donor for

Received: January 8, 2015; Accepted: February 10, 2015.
* Corresponding author, e-mail: kaoch@ntu.edu.tw
[1] Professor Emeritus, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

many biological reactions (Xiang *et al.* 2001). The nucleophilic nature of the thiol group is also important in the formation of mercaptide bonds with metals and for reacting with select electrophilies (Xiang *et al.* 2001).The reactivity, stability, and high water solubility of GSH make it an ideal biomolecule to plants against abiotic stresses. GSH is involved in many cellular processes including detoxification of xenobiotics (Dixon *et al.* 1998), sequestration of heavy metals (Cobbett & Goldsbrough 2002), and defense against ROS (Foyer & Noctor 2005). In addition, GSH is a substrate for glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPX) which are also involved in the removal of ROS (Noctor *et al.* 2002).

GSH is synthesized from two-consecutive ATP-dependent reactions. In the first step *γ*-glutamylcysteine (EC) is formed from L-glutamate and L-cysteine by *γ*-glutamylcysteine synthetase (ECS). The second step is catalyzed by glutathione synthetase which adds glycine to C-terminal of EC forming GSH. ECS is a major regulatory enzyme in GSH biosynthesis. The plastid is the compartment for GSH biosynthesis. GSH is one of the major forms of organic sulfur that translocate in the phloem (Herschbach & Rennenberg 1994) and therefore must move between cells, either apoplastically, symplastically, or both. Uptake of GSH has been reported in both cells and protoplasts (Schneider *et al.* 1992; Jamai *et al.* 1996). Several different types of transporters may be important in translocation of GSH between subcellular compartments (Noctor *et al.* 2012). The availability of *γ*-EC and cysteine is important for GSH synthesis (Noctor *et al.* 2012). Other factors that may affect GSH contents in plants include glycine and ATP (Ogawa *et al.* 2004).

GLUTATHIONE-RELATEDENZYMES

In almost all the biological functions, GSH is oxidized to glutathione disulfide (GSSG), which should be converted back to GSH in the cell to perform normal physiological functions. Thus, rapid recycling of GSH is more important than synthesis of GSH. The glutathione reductase (GR) catalyzes GSSG back to GSH at the expense of NADPH. It maintains the balance between GSH and ascorbate pools. GR was first reported in wheat germ (Conn & Vennesland 1951) and germinated pea (Mapson & Goddard 1951). GR has been purified and characterized from rice (Kaminaka *et al.* 1998). It is located predominately in chloroplasts, but a small amount of this enzyme has also been found in mitochondria and cytosol (Gechev *et al.* 2006). In higher plants, GR is encoded by more than one gene (Edwards *et al.* 1990). Three genes encoding GR have been described for rice: a cytosolic (*OsGR2*) (Kaminaka *et al.* 1998) and two chloroplastic isoforms (*OsGR1* and *OsGR3*) (Bashir *et al.* 2007; Wu *et al.* 2013). Wu *et al.* (2013) observed that both *OsGR1* and *OsGR3* are proteins dually targeted to chloroplasts and mitochondria in rice roots. Expression of *OSGR2* and *OsGR3* in NaCl-treated rice roots is regulated by H_2O_2 but not abscisic acid (Hong *et al.* 2009).

The GSH/GSSG ratio is decreased by oxidative stress, indicating that GSH and GSSG constitute a cellular redox buffer. GR has a role in maintaining a high GSH/GSSG ratio. A number of abiotic stresses have been shown to affect the activity of GR in plants (Gill & Tuteja 2010). To determine whether heterologous expression of *OsGR* can reduce the deleterious effects of abiotic conditions, Kim *et al.* (2012) constructed a transgenic yeast expressing *OsGR*. They demonstrated that *OsGR* expression in the yeast cells increases the ability of yeast to adapt to abiotic stresses, such as exposure to menadione (a free radical generator), heat shock, and heavy metals. Clearly, GR also has roles in defending against ROS.

Glutathione S-transferases (GSTs), also known as glutathione transferases, are enzymes involved in cellular detoxification by conjugating GSH to a wide variety of electrophilic

compounds. GSTs are localized in apoplast, cytosol, chloroplasts, mitochondria, and nucleus (Gechev *et al.* 2006). Herbicide atrazine is active on many annual broad-leaf weeds, while many commercial grass crops are naturally tolerant. An atrazine-susceptible maize strain was reported by Grogan *et al.* (1963). The identification of an atrazine-GSH conjugate was the first evidence of herbicide metabolism in plants by GSH conjugation, and this conjugation was shown to be the primary pathway for atrazine detoxification in maize (Shimabukuro & Swanson 1969). The first plant GST, which is responsible for conjugating the atrazine with GSH, was identified in maize by Frear & Swanson (1970). Plant GSTs can also function as glutathioneperoxidases (GPXs) (Bartling *et al.* 1993; Cummins *et al.* 1999), protect from oxidative stress (Hayes & McLellan 1999). Some of GSTs were originally identified as auxin- and cytokinin-binding proteins (Bilang & Sturm 1995; Gonneau *et al.* 1998), indicating that GSTs can also act in hormonal signal transduction. Based on the predicated amino acid sequences, the GSTs in plants have been grouped into several classes, including phi (F), tau (U), lamda (L), theata (T), and zeta (Z) (Dixon *et al.* 2002). The first plant GST cDNA sequence was published by Wiegand *et al.* (1986). To date, a total of 79 putative GST genes have been identified in rice (Jain *et al.* 2010). Many GST genes are regulated by plant hormones auxin and cytokinin, abiotic stresses, and biotic stresses (Jain *et al.* 2010).

GPXs are a family of multiple isozymes which catalyze the reduction of H_2O_2 and lipid hydroperoxides by GSH and the reforehelp to protect the cell from oxidative damage (Eshdat *et al.* 1977). GPXs are located in plant cytosol, chloroplasts, mitochondria, and endoplasmic reticulum (Gechev *et al.* 2006). However, one should be aware that in some of the above mentioned cases the observed GPX activity might have been due to the presence of GST. GPXs are considered as one of key enzymes involved in scavenging ROS. However, little is known about the response of GPXs in rice plants to abiotic stresses.

ROLE IN ABIOTIC STRESS OF RICE PLANTS

Chilling stress

Cold temperature can be distinguished from freezing in terms of the range of temperatures that cause the related damages. Many species of tropical or subtropical origin are injured or killed by nonfreezing low temperatures, and exhibit various symptoms of chilling injury such as chlorosis, necrosis, or growth retardation. In contrast, chilling-tolerant species are able to grow at such low temperatures (Sanghera *et al.* 2011). Rice plants are injured at the seedling stage when they are grown early spring in temperate and subtropical environment. A positive correlation between tolerance of chilling-induced photoinhibition and high GR activities has been demonstrated in rice (Kuk *et al.* 2003; Huang & Guo 2005). Proteomic analysis of chilling stress in rice also showed the upregulation of cysteine synthase (Yan *et al.* 2006). This enzyme is responsible for the final step in cysteine biosynthesis, a key limiting step in GSH synthesis. Thus, GSH and GR are important for tolerance to chilling stress.

To develop a rice cultivar that is suitable for growing in low temperature and submergence conditions, Takesawa *et al.* (2002) generated transgenic rice plants overexpressing a zeta class GST gene (GSTZ) under the control of a maize ubiquitin promoter. These transgenic rice lines enhance germination and growth of both roots and shoots at low temperature and submergence. The GSTZ in transgenic lines was observed to have higher GST/GPX activities than non-transformant. The GSTZ is suggested to have dual enzyme function (GST/GPX) in transgenic rice seedlings.

Andaya & Mackill (2003) developed a recombinant inbred line mapping population us-

ing cold tolerant California temperate japonica cultivar 'M202' and the cold sensitive indica cultivar 'IR50'. Genetic analysis of this population for seedling tolerance led to the identification of a major QTL (quantitative trait locus) on rice chromosome 12 for tolerance of cold-induced wilting and necrosis, designated as *qCTS12*. To identify the gene(s) underlying *qCTS12*, Andaya & Tai (2006) further studied the fine mapping of this locus. They demonstrated that *OsGSTZ1* and *OsGSTZ2* are the genes responsible for the tolerance to cold-induced wilting and necrosis conferred by *qCTS12*. Later work by Kim *et al.* (2011) revealed that a single amino acid change from Ile^{99} to Val^{99} in *OsGSTZ2* causes a significant reduction in its catalytic activity and the corresponding SNP (single nucleotide polymorphism) appears to be highly associated with cold sensitivity of rice seedlings. These results are in agreement with previous evidence that overexpression of GSTZ in transgenic rice seedlings enhances cold tolerance (Takesawa *et al.* 2002).

Salt stress

Soil salinity, particularly due to NaCl, can be considered as the most widespread soil toxicity problem for global rice production at present. A consequence of salt stress in rice plants is also the production of ROS, especially H_2O_2 (Lin & Kao 2001; Hong *et al.* 2009; Yamane *et al.* 2009; Yamane *et al.* 2012). Rice is a salt-sensitive cereal crop and is more affected at seedling stages. Yamane *et al.* (2012) demonstrated that H_2O_2 accumulation was observed in the chloroplasts, mitochondria, peroxisome, plasma membrane, and cell walls of rice plants under salinity.

Using two rice genotypes 'Pokkali' (salt-tolerant) and 'BRRI dhan29' (salt-sensitive), Hossain *et al.* (2013) investigated the efficacy of AsA-GSH cycle for scavenging H_2O_2 during salt stress. They demonstrated that 'Pokkali' exhibits increased GR activity, whereas 'BRRI dhan29' has no effect on GR activity during salt stress. The maintenance of sufficient GSH pool by GR in 'Pokkali' leads to increased antioxidant activity, which in turn improves tolerance to salt stress. Similarly, drought tolerant rice seedlings have higher GR and GST activities and a higher GSH content under water deficit when compared to the drought sensitive rice seedlings (Pyngrope *et al.* 2013). These results suggest that drought tolerant rice seedlings also have higher capacity to maintain GSH pool to meet the challenge of water deficit.

As mentioned earlier, *ECS* is the key enzyme of the GSH biosynthetic pathway in plants. A variety of transgenic plants overexpressing *ECS* has been reported to have higher tolerance to salt stress (Gullner *et al.* 2001; Gill & Tuteja 2010). The levels of GSH and salt stress response via *ECS* overexpression are recently reported in rice by Choe *et al.* (2013). They generated transgenic rice plants overexpressing *OsECS* under the control of an inducible promoter (*Rab21*). The transgenic rice plants increase tolerance to paraquat (PQ)- and salt-mediated oxidative stress through maintenance of cellular homeostasis via an enhanced GSH pool. Moreover, these transgenic rice plants increase grain and biomass under paddy field conditions.

Studies of GR in the past were largely carried out in dicot plants, especially tobacco (Chalapathi Rao & Reddy 2008). In most of those cases, the *E. coli GR* not endogenous genes, was overexpressed in plants. Recently, using a knockout mutant (*gr3*) and rescue line C1, Wu *et al.* (2015) investigated the role of *OsGR3* gene in NaCl tolerance of rice plants. Results showed that *gr3* mutant reduces GR activity, is sensitive to NaCl andPQ, and has low GSH content and low GSH/GSSG ratio. Moreover, the gr3-complementation line C1 recovers the GR activity and NaCl tolerance. Clearly, GR3 may play an important role in NaCl tolerance by regulating the GSH redox state in rice.

It has been shown that salt stress induced GST gene in the sensitive cultivar of indica rice 'IR29' but not the tolerant 'FL478' (Walia *et al.* 2005). Recently, Sharma *et al.* (2014) characterized a rice tau class GST gene, *OsGSTU4*. Overexpressing this gene in *E. coli* resulted in higher GST activity and better growth under salinity, osmotic, and oxidative stresses. In *Arabidopsis*, overexpression of *OsGSTU4* also shows tolerance to salinity and oxidative stress, which may be due to enhanced GST activity and decreased accumulation of ROS (Sharma *et al.* 2014). They suggested that *OsGSTU4* can be used to generate stress tolerant crop plants.

Copper and cadmium excess

Cu is essential for the plant growth. Excess Cu can generate ROS (Fernandes & Henriques 1991) and is able to stimulate the production of •OH in a Fenton-type reaction (Sadmann & Borger 1980). Cd is a non-redox metal unable to produce ROS via Fenton and/or Haber-Weiss reactions. However, evidence has demonstrated that Cd stress causes oxidative stress in plants (Hsu & Kao 2007). Thus, mechanisms by which plants can withstand toxicity of excess Cu or Cd include restriction the uptake of Cu or Cd and detoxification of Cu- or Cd-induced ROS.

Excess Cu exposure results in toxic symptoms such as stunted growth, leaf chlorosis, and leaf rolling of rice seedlings. Proteomic changes in response to excess Cu were studied by Ahsan *et al.* (2007) in germinated rice seeds. Differentially displayed proteins were identified by MALDI-TOF mass spectroscopy. The up-regulation of some antioxidants and stress-related proteins was observed in Cu-treated germinating rice seeds, indicating that excess Cu generates oxidative stress that might be disruptive to other important metabolic processes. Exogenous GSH decreases symptoms of Cu toxicity, diminishes Cu-induced production of ROS, and restricts Cu uptake (Mostofa *et al.* 2014). Using proteomic approach, Song *et al.* (2013) demonstrated that GST exhibits a greater increase in response to excess Cu in the Cu-tolerant rice cultivar B1139 compared with the Cu-sensitive B1195.

On treatment with Cd, the content of GSH decreases in rice seedlings of Cd-sensitive cultivar ('Taichung Native 1'; 'TN1') but not in the seedlings of Cd-tolerant cultivar ('Tainung 67'; 'TNG67').In earlier work, Hsu & Kao (2007) demonstrated that Cd toxicity is mainly due to H_2O_2 accumulation in 'TN1' rice seedlings. Thus, 'TNG67' seedlings experienced lower oxidative stress from Cd exposure than 'TN1'. Exogenous GSH reduces the subsequent Cd-induced toxicity of 'TN1' seedlings (Chao *et al.* 2011).The importance of GSH in regulating Cd toxicity is supported further by the facts that exogenous application of the buthionine sulfoximine (BSO), aspecific inhibitor of GSH biosynthesis, to seedlings of 'TNG67' decreases GSH content and increases subsequent Cd toxicity (Chao *et al.* 2011). Cai *et al.* (2011) alsodemonstrated that rice genotypic difference in the tolerance to Cd is positively linked to the capacity of elevation of GSH.

GST may catalyze Cd complexation with GSH (Adamis *et al.* 2004), thereby alleviating Cd toxic effects and promoting Cd retention in plant roots. Zhang *et al.* (2013b) reported that Cd can be retained and detoxified in rice roots through chelation with thiol compounds and subsequent sequestration. In another paper, Zhang *et al.* (2013a) purified GST from Cd-stressed rice roots and identified that a tau class rice GST is vital in Cd detoxification

Herbicide treatment

Herbicides are also known to generate ROS in the chloroplast in the light (Foyer *et al.* 1995). PQ, also known as methyl viologen, is a herbicide widely used in agriculture and has long been known to exert its toxic effects by catalyzing the transfer of electrons from photosystem I of chloroplast membranes to molecular oxygen producing ROS (Calderbank 1968). Chang & Kao (1995) also reported that

normally operated photosynthetic electron transport is essential for PQ-induced toxicity in rice leaves. PQ toxicity in rice leaves can be scavenged by increasing GR activity (Chang & Kao 1997).

It has been shown that GST in maize is responsible for herbicide atrazine detoxification (Shimabukuro & Swanson 1969). The function of the lambda class GST (GSTL) is not well understood. To test whether *OsGSTL1* has GSH conjugating activity, Hu *et al.* (2008) transformed yeast strains with *OsGSTL1*. They found that transgenic strains with OsGSTL1 have higher GSH conjugating activity than anon-transgenic strain. Glyphosate is a non-selective systemic herbicide, and chlorsulfuron is a selective herbicide. Later work by Hu *et al.* (2009) demonstrated that overexpression of *OsGSTL1* in rice plants enhances tolerance to glyphosate and chlorsulfuron, and the accumulation of *OsGSTL1* protein confers elevated GST and GPX activities. Recently, Hu (2014) also reported that overexpressing *OsGSTL2* in rice plants also protects plants from the injury caused by herbicides.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

This article gives a clear overview of the biochemical aspects of GSH and its related enzymes in rice plants subjected to abiotic stresses. It is now well established that GSH is synthesized from glutamate, cysteine, and glycine. It has been shown that GSH, GR, GST, and GPX play central role in scavenging ROS in rice plants under conditions of salt, low temperature, copper and cadmium excess, and herbicide treatment.

Increase in GR activity during stress should be achieved by increased GR protein synthesis and/or through changes in isoform population of GR. It is also important to characterize which isoform is crucial for a particular stress and how the expression of particular isoform is regulated in rice plants. Overexpressing or expressing antisense constructs resulting in inhibition of specific GSH related enzymes or mutants with impaired ROS generation may be extremely useful for creating transgenic rice plants to understand the role of GSH in rice plants in response to stress conditions. Most of the work regarding the functional aspects of GSH in rice plants has been done in laboratory. In future, studies are required to evaluate stress-tolerant transgenic rice plants in field trials under real stress conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The author would like to acknowledge with gratitude the contribution of colleagues and students to the personal research reported. Research in the author’s laboratory has been supported by the National Science Council of the Republic of China (Taiwan).

REFERENCES

Adamis, P. D. B., D. S. Gomes, M. L. C. C. Pinto, A. D. Panek, and E. C. A. Eleutherio. 2004. The role of glutathione transferases in cadmium stress. Toxicol. Lett. 154:81–88.

Ahsan, N., D. G. Lee, S. H. Lee, K. Y. Kang, J. J. Lee, P. J. Kim, H. S. Youn, J. S. Kim, and B. H. Lee. 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating seeds. Chemosphere 67:1182–1193.

Andaya, V. C. and D. J. Mackill. 2003. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice. J. Exp. Bot. 54:2579–2585.

Andaya, V. C. and T. H. Tai. 2006. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. Theor. Appl. Genet. 113:467–475.

Bartling, D., R. Radizio, U. Steiner, and E. W. Weiler. 1993. A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization. Eur. J. Biochem. 216:579–586.

Bashir, K., S. Nagasaka, R. N. Itai, T. Kobaysahi, M. Takahashi, H. Nakanishi, S. Mori, and N. K. Nishizawa. 2007. Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants. Plant Mol. Biol. 64:277–284.

Bilang, J. A. and A. Sturm. 1995. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. Plant Physiol. 109:253–260.

Cai, Y., F. Cao, W. Cheng, G. Zhang, and F. Wu. 2011. Modulation of exogenous glutathione in phytochelatins and photosynthetic performance against Cd stress in the two rice genotypes differing in Cd tolerance. Biol. Trace Elem. Res. 143:1159–1173.

Calderbank, A. 1968. The bipyridylium herbicides. Adv. Pest. Control Res. 8:127–235.

Chalapathi Rao, A. S. V. and A. R. Reddy. 2008. Glutathione reductase: A putative redox regulatory system in plant cells. p.111–147. *in*: Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants. (Khan, N. A., S. Singh, and S. Umar, eds.) Springer-Verlag. Berlin. 372 pp.

Chang, C. J. and C. H. Kao. 1995. Paraquat-induced chlorophyll loss in rice leaves: Evidence for the involvement of light and photosynthetic electron transport. Chin. Agron. J. 5:257–283.

Chang, C. J. and C. H. Kao. 1997. Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. Physiol. Plant. 101:471–476.

Chao, Y. Y., C. Y. Hong, C. Y. Chen, and C. H. Kao. 2011. The importance of glutathione in defence against cadmium-induced toxicity of rice seedlings. Crop Environ. Bioinform. 8:217–228.

Choe, Y. H., Y. S. Kim, I. S. Kim, M. J. Bae, E. J. Lee, Y. H. Kaim, H. M. Park, and H. S. Yong. 2013. Homologous expression of γ-glutamylcysteine synthetase increases grain yield and tolerance of transgenic rice plants to environmental stresses. J. Plant Physiol. 170:610–618.

Cobbett, C. and P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. 53:159–182.

Conn, E. E. and B. Vennesland. 1951. Glutathione reductase of wheat germ. J. Biol. Chem. 192:17–28.

Cummins, I., D. J. Cole, and R. Edwards. 1999. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. Plant J. 18:285–292.

Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, and D. Inze. 2000. Dural action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 57:779–795.

Dixon, D. P., D. J. Cole, and R. Edwards. 1998. Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. Plant Mol. Biol. 36:75–87.

Dixon, D. P., A. Lapthorn, and R. Edwards. 2002. Plant glutathione transferases. Genome Biol. 3:reviews 30004.1–30004.10.

Edwards, E. A., S. Rawsthorne, and P. M. Mullineaux. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). Planta 180:278–284.

Eshdat, Y., D. Holland, Z. Faltin, and G. Ben-Hayyim. 1997. Plant glutathione peroxidases. Physiol. Plant 100:234–240.

Fernandes, J. C. and F. S. Henriques. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. Bot. Rev. 57:246–273.

Foyer, C. H. and G. Noctor. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell Environ. 28:1056–1071.

Foyer, C. H., N. Souriau, S. Peret, M. Lelandais, K. J. Kunert, C. Pruvost, and L. Jouanin. 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increase in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. Plant Physiol. 109:1047–1057.

Frear, D. S. and H. R. Swanson. 1970. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazine) glutathione: Partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. Phytochemistry 9:2123–2132.

Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 247:1–11.

Gechev, T. S., F. Van Breusegem, J. M. Stone, I. Denev, and C. Laloi. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. BioEssays 28:1091–1101.

Gill, S. S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48:909–930.

Gonneau, M., R. Momet, and M. Laloue. 1998. A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. Physiol. Plant. 103:114–124.

Grogan, C. O., E. F. Eastin, and R. D. Palmer. 1963. Inheritance of susceptibility of a line of maize to simazine and atrazine. Crop Sci. 3:451.

Gullner, G., T. Kömives, and H. Rennenberg. 2001. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. J. Exp. Bot. 52:971–979.

Hayes, J. D. and L. I. McLellan. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a

co-ordinately regulated defense against oxidative stress. Free Rad. Res. 31:273–300.

Herschbach, E. and H. Rennenberg. 1994. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. J. Exp. Bot. 45:1069–1076.

Hong, C. Y., Y. Y. Chao, M. Y. Yang, S. Y. Cheng, S. C. Cho, and C. H. Kao. 2009. NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. Plant Soil 320:103–115.

Hossain, M. A., M. R. Ismail, M. K. Uddin, M. Z. Islam, and M. Ashrafuzzaman. 2013. Efficacy of ascorbate-glutathione cycle for scavenging H_2O_2 in two contrasting rice genotypes during salinity stress. Aust. J. Crop Sci. 7:1801–1808.

Hsu, Y. T. and C. H. Kao. 2007. Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Soil 298:231–241.

Hu, T. Z. 2014. A glutathione S-transferase confers herbicide tolerance in rice. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 14:76–81.

Hu, T. Z., X. Y. Huang, G. S. Xiao, and X. X. Qv. 2008. Molecular cloning, expression and activity analysis of a glutathione S-transferase in rice. Acta Bot. Yunanica 30:688–692.

Hu, T. Z., X. X. Qv, G. S. Xiao, and X. Y. Huang. 2009. Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over expression a glutathione S-transferase. Mol. Breed. 24:409–418.

Huang, M. and Z. Guo. 2005. Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. Biol. Plant. 49:81–84.

Jain, M., C. Ghanashyam, and A. Bhattacharjee. 2010. Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. BMC Genom. 11:73.

Jamai, A., R. Tommasini, E. Martinoia, and S. Delrot. 1996. Characterization of glutathione uptake in broad bean protoplasts. Plant Physiol. 111:1145–1152.

Kaminaka, H., S. Morita, M. Nakajimma, T. Masumura, and K. Tanaka. 1998. Gene cloningand expression of cytosolic glutathione reductase in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiol. 39:1269–1280.

Kim, I. S., Y. S. Kim, and H. S. Yoon. 2012. Glutathione reductase from *Oryza sativa* increases acquired tolerance to abiotic stresses in a genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strain. J. Microbiol. Biotechnol. 22:1557–1567.

Kim, S., V. C. Andaya, and T. H. Tai. 2011. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isoenzyme GSTZ2. Biochem. J. 435:373–380.

Kuk, Y. I., J. S. Shin, N. R. Burgos, T. E. Hwang, O. Han, B. H. Cho, S. Jung, and J. O. Guh. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. Crop Sci. 43:2109–2117.

Lin, C. C. and C. H. Kao. 2001. Cell wall peroxidase, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. Plant Soil 230:135–143.

Mapson, L. W. and D. R. Goddard. 1951. Reduction of glutathione by coenzyme II. Nature 167:975–977.

Mostofa, M. G., Z. I. Seraaj, and M. Fujita. 2014. Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Protoplasma 251:1373–1386.

Noctor, G. and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:249–279.

Noctor, G., L. Gomez, H. Vanacker, and C. H. Foyer. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. J. Exp. Bot. 53:1283–1304.

Noctor, G., A. Mhamdi, S. Chaouch, Y. Han, J. Neukermans, S. Marquez-Garcia, G. Queval, and C. H. Foyer. 2012. Glutathione in plants: An integrated overview. Plant Cell Environ. 35:454–484.

Ogawa, K., A. Hatano-Iwasaki, M. Yanagida, and M. Iwabuchi. 2004. Level of glutathione is regulated by ATP-dependent ligation of glutamate and cysteine through photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Mechanism of strong interaction of light intensity with flowering. Plant Cell Physiol. 45:1–8.

Pyngrope, S., K. Bhoomika, and R. S. Dubey. 2013. Reactive oxygen species, ascorbate-glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. Protoplasma 250:585–600.

Sadmann, G. and P. B. Boger. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. Plant Physiol. 66:797–800.

Sanghera, G. S., S. H. Wani, W. Hussain, and N. B. Singh. 2011. Engineering cold stress tolerance in crop plants. Curr. Genomics 12:30–43.

Schneider, A., N. Martini, and H. Rennenberg. 1992. Reduced glutathione (GSH) transport in cultured tobacco cells. Plant Physiol. Biochem. 30:29–38.

Sharma, R., A. Sahoo, R. Devemdran, and M. Jain. 2014. Over-expression of a rice tau class glutathione S-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stress in Arabidopsis. PLoS One 9:e92900.

Shimabukuro, R. H. and H. R. Swanson. 1969. Atrazine metabolism, selectivity, and mode of action. J. Agric. Food Chem. 17:199–205.

Song, Y., J. Cui, H. Zhang, G. Wang, F. J. Zhao, and Z. Shen. 2013. Proteomics analysis of copper stress responses in the roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Plant Soil 366:647–658.

Takesawa, T., M. Ito, H. Kanzaki, N. Kameya, and I. Nakamura. 2002. Overexpressionof ζ glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. Mol. Breed. 9:93–101.

Walia, H., C. Wilson, P. Condamine, X. Liu, A. M. Ismail, L. Zeng, S. I. Wanamaker, J. Mandal, J. Xu, X. Cui, and T. J. Close. 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth. Plant Physiol. 139:822–835.

Wiegand, R. C., D. M. Shah, T. J. Mozer, E. I. Harding, J. Diza-Collier, C. Saunders, E. G. Jaworski, and D. C. Tiemeier. 1986. Messenger RNA encoding a glutathione S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. Plant Mol. Biol. 7:235–243.

Wu, T. M., W. R. Lin, C. H. Kao, and C. Y. Hong. 2015. Gene knockout of *glutathione reductase 3* results in increased sensitivity to salt stress in rice. Plant Mol. Biol. 87:555–564.

Wu, T. M., W. R. Lin, L. T. Kao, Y. T. Hsu, C. H. Yeh, C. Y. Hong, and C. H. Kao. 2013. Identification and characterization of a novel chloroplast/mitochondria co-localized glutathione reductase 3 involved in salt stress response in rice. Plant Mol. Biol. 83:379–390.

Xiang, C., B. L. Wemer, E. M. Christensen, and D. J. Oliver. 2001. The biological functions of glutathione revisited in Arabidopsis transgenic plants with altered glutathione levels. Plant Physiol. 126:564–574.

Yamane, K., S. Mitsuya, M. Taniguchi, and H. Miyake. 2009. Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf. Plant Prod. Sci. 12:319–326.

Yamane, K., M. Taniguchi, and H. Miyake. 2012. Salinity-induced subcellular accumulation of H_2O_2 in leaves of rice. Protoplasma 249:301–308.

Yan, S. P., Q. Y. Zhang, Z. C. Tang, W. A. Su, and W. N. Sun. 2006. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. Mol. Cell. Proteomics 5:484–496.

Zhang, C., Z. Wu, J. U. Ting, G. E. Ying, and W. Cheng. 2013a. Purification and identification of glutathione S-transferase in rice root under cadmium stress. Rice Sci. 20:173–178.

Zhang, C., X. Yin, K. Gao, Y. Ge, and W. Cheng. 2013b. Non-protein thiols and glutathione S-transferase alleviate Cd stress and reduce root-to-shoot translocation of Cd in rice. J. Plant Nutr. Soil Sci. 176:626–633.

榖胱甘肽與水稻環境逆境

高景輝 [1,*]

摘要

高景輝。2015。榖胱甘肽與水稻環境逆境。台灣農業研究 64(3):167–176。

榖胱甘肽、榖胱甘肽還原酵素、榖胱甘肽 S-轉移酵素與榖胱甘肽過氧化酵素為活化氧族清除系統之成員。本文係綜合討論榖胱甘肽及其相關酵素在水稻環境逆境下所扮演之角色。證據顯示榖胱甘肽可調控水稻在低溫、鹽分、過量銅與鎘及除草劑處理之抗性。

關鍵詞：榖胱甘肽、榖胱甘肽過氧化酵素、榖胱甘肽還原酵素、榖胱甘肽 S-轉移酵素、水稻。

投稿日期：2015 年 1 月 8 日；接受日期：2015 年 2 月 10 日。
* 通訊作者：kaoch@ntu.edu.tw
1 國立台灣大學農藝學系名譽教授。台灣 台北市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):177–188 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.02

研究報告

地黃無菌播種及微體繁殖研究

曹進義[1] 陳威臣[1] 吳姿穎[2] 夏奇鋸[3,*]

摘要

曹進義、陳威臣、吳姿穎、夏奇鋸。2015。地黃無菌播種及微體繁殖研究。台灣農業研究 64(3):177–188。

本研究利用地黃 (*Rehmannia glutinosa* Libosch) 種子進行無菌播種，地黃種子以 0.6% 次氯酸鈉溶液消毒 15 min 可獲得良好之殺菌效果，可明顯降低汙染率，並有最高發芽率，分別為 5% 與 80%。以無菌播種地黃小苗之葉片與葉柄作為微體繁殖材料，接種於含有 3% 蔗糖、0.8% Bacto agar 及 0.01 mg L^{-1} NAA 之 MS 培養基 (以下簡稱基本培養基) 並添加 0–2.0 mg L^{-1} BA 不同濃度，分別於光照與黑暗環境下培養。結果顯示，暗處理下培植體有較高之成活率，且葉柄培植體較葉片培植體之再生反應為佳，葉柄培植體於含有 2.0 mg L^{-1} BA 培養基中於黑暗環境下培養具有最高之存活率 62%，可同時誘導出芽體與癒傷組織，分別為 10% 與 62%。另以地黃組培苗之頂芽莖段與莖中段 2 種不同莖段部位作為微體繁殖材料，接種於添加不同蔗糖濃度 (3–9%) 之基本培養基中培養，結果顯示以 3% 蔗糖為最佳，成活率可達 100%，9% 高蔗糖濃度為最差，會導致培植體褐化死亡。進一步利用組培苗之頂芽莖段、莖中段與近基部莖段 3 種不同莖段部位培植體培養於含有 3% 蔗糖濃度並添加 0–2.0 mg L^{-1} BA 濃度之基本培養基中誘導芽體，3 種培植體中以頂芽莖段表現最佳，成活率為 80–100%，BA 濃度於 0.5–1.0 mg L^{-1} 之間可誘導出最多芽體，每 1 培植體平均可誘導出 27 個芽。莖段培植體與 BA 濃度二者皆顯著影響地黃芽體之誘導率與培養存活率，且二者間具有交感效應。

關鍵詞：地黃、微體繁殖、無菌播種、芽體誘導。

前言

地黃 (*Rehmannia glutinosa* Libosch) 屬於玄参科 (Scrophulariaceae) 植物，其地下根部是傳統中醫之重要藥材，具清熱生津、涼血、止血之功能 (Liao *et al*. 2007)。地黃為多年生異花授粉植物，經濟栽培一般不採用種子繁殖，在生產上採用塊根營養繁殖 (Wen *et al*. 2001)。由於地黃長期以塊根進行無性繁殖，因此多種病害常隨塊根傳播，其中又以病毒病害最為嚴重，田間感染率達 100%，病毒在植物體內代代相傳，導致品種退化 (Tien 1962; Wen *et al*. 2001)。感染病毒的植株由於品種不同、病程長短、環境條件和病原種類的變化，因此所表現出的症狀相當多樣，但通常可以觀察到地下塊根不能正常膨大，塊根表面粗糙、龍頭細長、產量低且品質變差，導致商品等級下降 (Wen *et al*. 2001)。台灣的地黃種原主要是早期自中國大陸引進，多年來相同來源的塊根不斷以無性繁殖方式推廣至台灣各地栽種，田間經常可發現植株葉部出現濃綠不均、嵌紋及皺縮等病毒感染之病徵，植株生長與塊根產量皆受到影響 (Liao *et al*. 2007)。根據 Liao *et al*. (2007) 的研究顯示，台灣地黃感染之病毒係屬於菸草嵌紋病毒 (*Tobacco mosaic virus*; TMV) 的 1 個獨立菌株系 (strain)，與感染中

投稿日期：2014 年 11 月 17 日；接受日期：2015 年 1 月 19 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

國河南地黃的 TMV 之核酸序列相似度高達 97.1%，二者的親緣關係極接近，推測很可能出自同一來源。根據 Tien (1962) 的研究顯示經由有性生殖而來的種子不帶有病毒，且種子繁殖可應用於雜交育種，是選育優質、高產新品種的主要途徑 (Wen *et al*. 2001)。本試驗以地黃異株雜交授粉所得之種子進行無菌播種，並建立微體大量繁殖之技術，除可獲得無病毒之地黃健康種苗外，並可應用於地黃種苗大量繁殖。

材料與方法

試驗材料及培養基配製

地黃種子係由行政院農業委員會農業試驗所生物技術組之作物機能研究室所提供。培養基配製完成後將 pH 皆調整至 5.6，再以 121℃ 滅菌 20 min。

消毒時間對地黃種子無菌播種之影響

以商業用之漂白水 Clorox® (USA) 稀釋 10 倍 (0.6% NaOCl) 進行消毒，消毒時間分別為 10、12、15 與 18 min，之後以無菌水清洗 3 次。消毒後之種子，接種於 9 cm 塑膠培養皿中之 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基 [添加 3% 蔗糖及 0.8% Bacto agar (Difco, USA)]，每皿接種 50 粒種子，每種消毒時間處理共接種 4 皿。培養室溫度為 25℃ ± 1℃，並於光照強度為 38 μmol m^{-2} s^{-1} 及 14 h 光週期環境培養 4 wk 後進行調查。

BA (6-Benzyladenine) 濃度與光照條件對葉片及葉柄培植體芽體誘導之影響

以無菌播種長出之地黃組培苗之葉片與葉柄作為微體繁殖材料，切取約 1 cm 長之葉片或葉柄作為培植體，接種於 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg L^{-1} 5 種不同濃度 BA 處理之基本培養基，每皿接種 10 個培植體，每種處理接種 8 皿。分別置於光照或黑暗的環境下培養 (即每種 BA 處理之光與暗培養各有 4 皿)，培養室及光照條件 (含下述試驗) 同前所述，培養 8 wk 後進行調查。

蔗糖濃度對莖段培植體生長之影響

將無菌播種長出之地黃無菌苗繼代至蘭花瓶中，待小苗生長至約 3 cm 高時，去除含有根之莖基部，將地上部區分成 1 cm 長之頂芽段與其下 1 cm 長之莖中段 2 種培植體，每 1 培植體皆含有 2 個節，分別接種於添加 3、6 與 9% 蔗糖濃度之上述基本培養基中。每瓶蘭花瓶置 100 mL 培養基，各處理接種 4 個蘭花瓶，每個蘭花瓶中接種 5 個培植體，培養 8 wk 後進行調查。

BA 濃度對地黃不同莖段培植體芽體誘導之影響

以頂芽段、莖中段以及莖基部段 (去除根) 3 個不同部位之莖段作為培植體，每個培植體約 1 cm 長，每 1 培植體皆含有 2 個節，分別接種於含有 3% 蔗糖並分別添加 0.0、0.125、0.25、0.5 與 1.0 mg L^{-1} BA 濃度之基本培養基中進行芽體誘導與增殖之試驗。每處理接種 4 個蘭花瓶，每個蘭花瓶接種 5 個培植體，培養 8 wk 後進行調查。

統計分析方法

試驗採用完全逢機 (completely randomized design; CRD)，上述 3 種試驗所得資料均經以 SAS 9.1.3 統計分析套裝軟體 (SAS Institute Inc. 2002) 進行變方分析 (ANOVA) 後，若處理間差異顯著，則再利用 Least Significant Difference (LSD) 測驗比較各處理平均值間之個別差異性。

結果

地黃種子經由不同消毒時間處理後之結果顯示，以 0.6% 次氯酸鈉溶液消毒 15 min 具有明顯之殺菌效果及種子發芽率，種子污染率與發芽率分別為 5% 與 80%，延長消毒時間至 18 min 雖然可降低汙染率 (2%)，但發芽率亦隨之降低為 40% (表 1)。

以無菌播種之組培苗作為微體繁殖材料，切取約 1 cm 大小之葉片與葉柄為培植體，接種於含有 0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg L^{-1} BA 濃度之基本培養基中，結果葉片培植體於

表 1. 以 0.6% 次氯酸鈉溶液配合不同消毒時間對地黃種子無菌播種之影響。

Table 1. Effect of various disinfection times with 0.6% sodium hypochlorite (NaOCl) on the *in vitro* seed germination of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Treatment time (min)	Contamination (%)	Germination (%)	Non-germination (%)
10	25 a[z]	60 b	15 b
12	18 b	65 b	17 b
15	5 c	80 a	15 b
18	2 c	50 c	48 a

[z] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

照光與黑暗條件下皆易褐化，僅於黑暗培養下 0.125–1.0 mg L^{-1} BA 中可誘導根生成，誘導率為 2–7%；於 1.0 與 2.0 mg L^{-1} BA 濃度下可誘導出癒傷組織，誘導率分別為 15% 與 5% (表 2、圖 1)，但無法誘導出芽體，最終褐化死亡。葉柄在光照培養下褐化率亦高，但有 5–7% 芽體誘導率；於黑暗中培養可提高成活率，其中以 1.0 mg L^{-1} BA 處理之芽體誘導率最高，為 20%；提高 BA 濃度至 2.0 mg L^{-1} 可提高存活率、癒傷組織誘導率，分別為 62% 與 62%，但芽體誘導率下降為 10%；於較低 BA 濃度 (0.125–0.5 mg L^{-1}) 培養基中，培植體有較高之根誘導率 (表 3、圖 2)，為 18–35%。

以地黃瓶苗之頂芽段與中間莖段 2 種莖段培植體分別接種於含有 3、6 與 9% 蔗糖濃度之基本培養基中，結果顯示 2 種培植體皆以培養在 3% 蔗糖濃度中有較佳之生長，其中又以頂芽段培植體表現較佳，成活率可達 100%，小苗之株高、葉數、葉長、葉寬與鮮重等性狀皆顯著優於其他蔗糖濃度。在 3% 蔗糖濃度下，中間莖段培植體雖然成活率較莖頂培植體為低 (70%)，小苗生長與發育近似於頂芽段培植體。

表 2. 光照培養下 BA 濃度與不同培植體對地黃芽體誘導之影響。

Table 2. Effect of BA concentrations and explant types on shoot induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch under the light culturing.

BA (mg L^{-1})	Explant type	Browning (%)	Survival (%)	Shoot induction (%)	Root induction (%)	Callus induction (%)
0.0	Leaf	100 a[z]	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
0.125	Leaf	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	95 a	5 a	5 ab	0 a	0 a
0.25	Leaf	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	95 a	5 a	5 ab	0 a	0 a
0.5	Leaf	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
	Petiole	100 a	0 a	0 b	0 a	0 a
1.0	Leaf	97 a	3 a	0 b	0 a	3 a
	Petiole	95 a	5 a	5 ab	0 a	5 a
2.0	Leaf	92 a	8 a	0 b	0 a	8 a
	Petiole	93 a	7 a	7 a	0 a	5 a
Explant type		NS[y]	NS	NS	NS	NS
BA		NS	NS	NS	NS	NS
Explant type × BA		NS	NS	NS	NS	NS

[z] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.
[y] Non-significant.

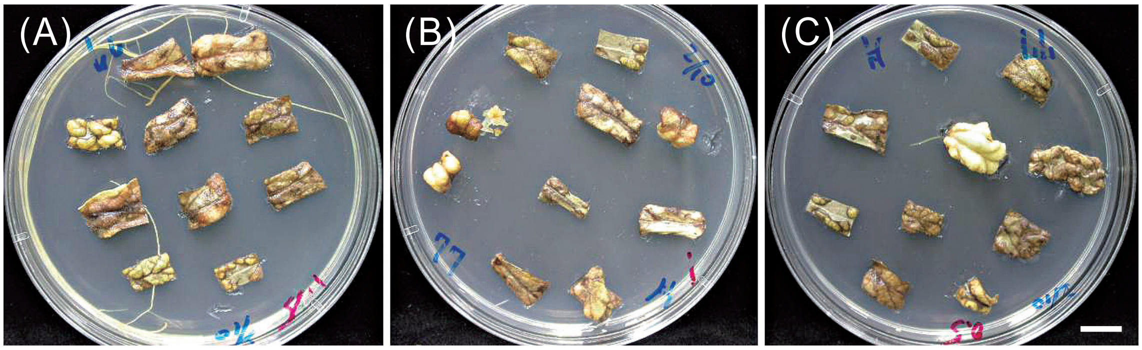

圖 1. 地黃葉片培植體以基本培養基添加不同 BA 濃度於黑暗中培養誘導不定根與癒傷組織之情形。(A) 0.125 mg L^{-1}；(B) 0.5 mg L^{-1}；(C) 1.0 mg L^{-1} BA (標尺 = 1 cm)。

Fig. 1. Leaf explants of *Rehmannia glutinosa* Libosch were cultured on the basal medium with various BA concentrations under dark condition for adventitious root and callus induction. BA concentration: (A) 0.125 mg L^{-1}; (B) 0.5 mg L^{-1}; and (C) 1.0 mg L^{-1} (Bar = 1 cm).

表 3. 黑暗培養下 BA 濃度與不同培植體對地黃芽體誘導之影響。

Table 3. Effect of BA concentrations and explant types on shoot induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch under the dark culturing.

BA (mg L^{-1})	Explant type	Browning (%)	Survival (%)	Shoot induction (%)	Root induction (%)	Callus induction (%)
0.0	Leaf	100 a[z]	0 f	0 c	0 d	0 d
	Petiole	100 a	0 f	0 c	0 d	0 d
0.125	Leaf	93 ab	7 ef	0 c	7 bcd	0 d
	Petiole	65 e	35 b	0 c	35 a	0 d
0.25	Leaf	100 a	0 f	0 c	0 d	0 d
	Petiole	68 e	32 b	0 c	32 a	32 b
0.5	Leaf	98 a	2 f	0 c	2 cd	0 d
	Petiole	63 e	37 b	3 c	18 b	37 b
1.0	Leaf	85 bc	15 de	0 c	2 cd	15 c
	Petiole	70 de	30 bc	20 a	8 bc	30 b
2.0	Leaf	80 cd	20 cd	0 c	0 d	5 cd
	Petiole	38 f	62 a	10 b	3 cd	62 a
Explant type		**[y]	**	**	**	**
BA		**	**	**	**	**
Explant type × BA		**	**	**	**	**

[z] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.
[y] ** Significant at 0.01 level.

隨著蔗糖濃度提升至 9% 時，莖頂及中間莖段培植體之成活率皆下降，芽體生長與發育受影響，芽體品質較差，尤其中間莖段培植體長出之小苗皆黃化死亡 (表 4、圖 3)。

以頂芽莖段、中間莖段與莖基部 3 種部位之莖段組織為培植體，分別接種於含有 3% 蔗糖並添加 0.0、0.125、0.25、0.5 與 1.0 mg L^{-1} BA 濃度之基本培養基中進行芽體誘導。結果顯示，3 種莖段培植體中以頂芽莖段有最佳之芽體誘導率，在不同 BA 濃度下培植體皆有較高的成活率，為 80–100%。其中，於 0.5 mg L^{-1} BA 每 1 培植體平均可誘導出 27 個芽為最高

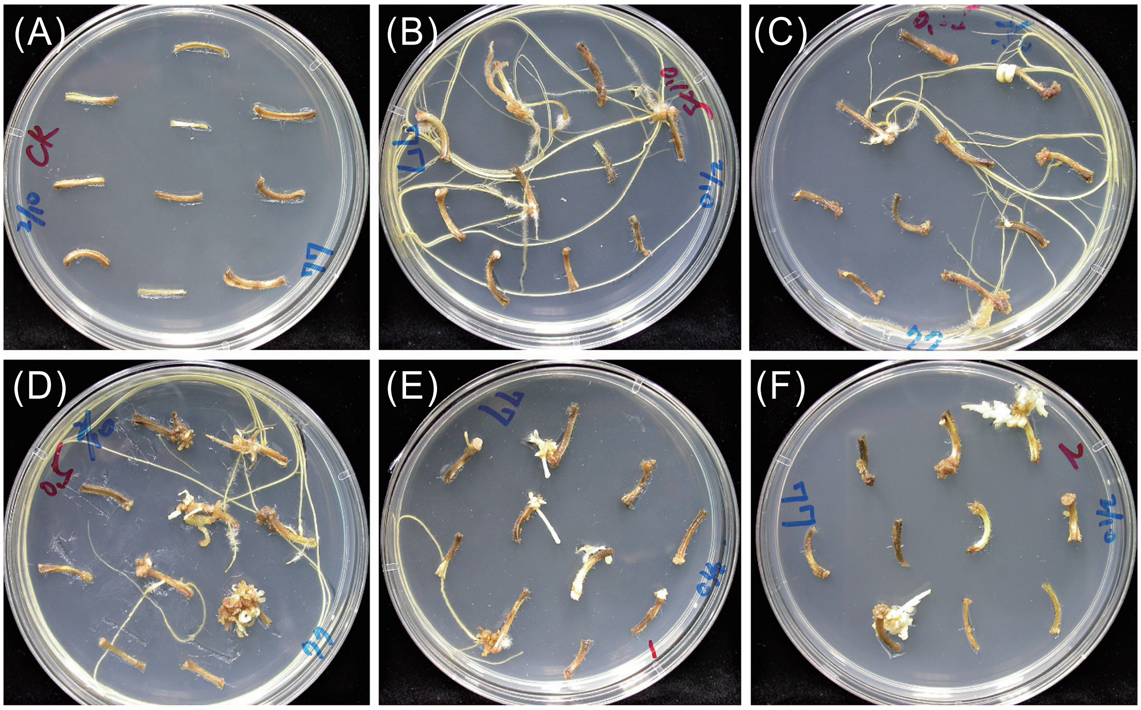

圖 2. 地黃葉柄培植體以基本培養基添加不同 BA 濃度於黑暗中培養誘導不定根、癒傷組織與芽體之情形。(A) 0.0 mg L^{-1}；(B) 0.125 mg L^{-1}；(C) 0.25 mg L^{-1}；(D) 0.5 mg L^{-1}；(E) 1.0 mg L^{-1}；(F) 2.0 mg L^{-1} BA (標尺 = 1 cm)。

Fig. 2. Petiole explants of *Rehmannia glutinosa* Libosch were cultured on the basal medium with various BA concentrations under dark condition for adventitious root, callus, and shoot induction. BA concentration: (A) 0.0 mg L^{-1}; (B) 0.125 mg L^{-1}; (C) 0.25 mg L^{-1}; (D) 0.5 mg L^{-1}; (E) 1.0 mg L^{-1}; and (F) 2.0 mg L^{-1} (Bar = 1 cm).

表 4. 地黃不同莖段培植體與蔗糖濃度對地黃芽體誘導與生長之影響。

Table 4. Effects of stem explant types and sucrose concentrations on shoot induction and growth of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Explant type	Sucrose (%)	Survival (%)	No. of shoot explant^{-1}	No. of root explant^{-1}	Shoot height (cm)	No. of leaves explant^{-1}	Leaf length[z] (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)
Shoot tip	3%	100 a[y]	1 a	6.4 a	8.4 a	11.6 ab	4.6 a	2.0 a	2.5 a
	6%	100 a	1 a	5.0 ab	6.4 b	9.4 bc	3.2 b	1.2 c	1.4 b
	9%	80 b	1 a	2.8 b	3.9 c	7.8 c	1.7 c	0.8 d	0.4 c
Inter-nodalsegment	3%	70 b	1 a	6.0 a	8.6 a	12.4 a	3.9 ab	2.0 a	3.0 a
	6%	50 c	1 a	4.2 ab	5.7 b	10.2 abc	3.3 b	1.6 b	1.1 bc
	9%	0 d	0 b	-[x]	-	-	-	-	-
Sucrose	**	NS[w]	NS	**	**	**	**	**	**
Explant	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sucrose explant	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

[z] The largest leaf.
[y] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.
[x] No survival explant was found.
[w] NS, *, **: Non-significant or significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

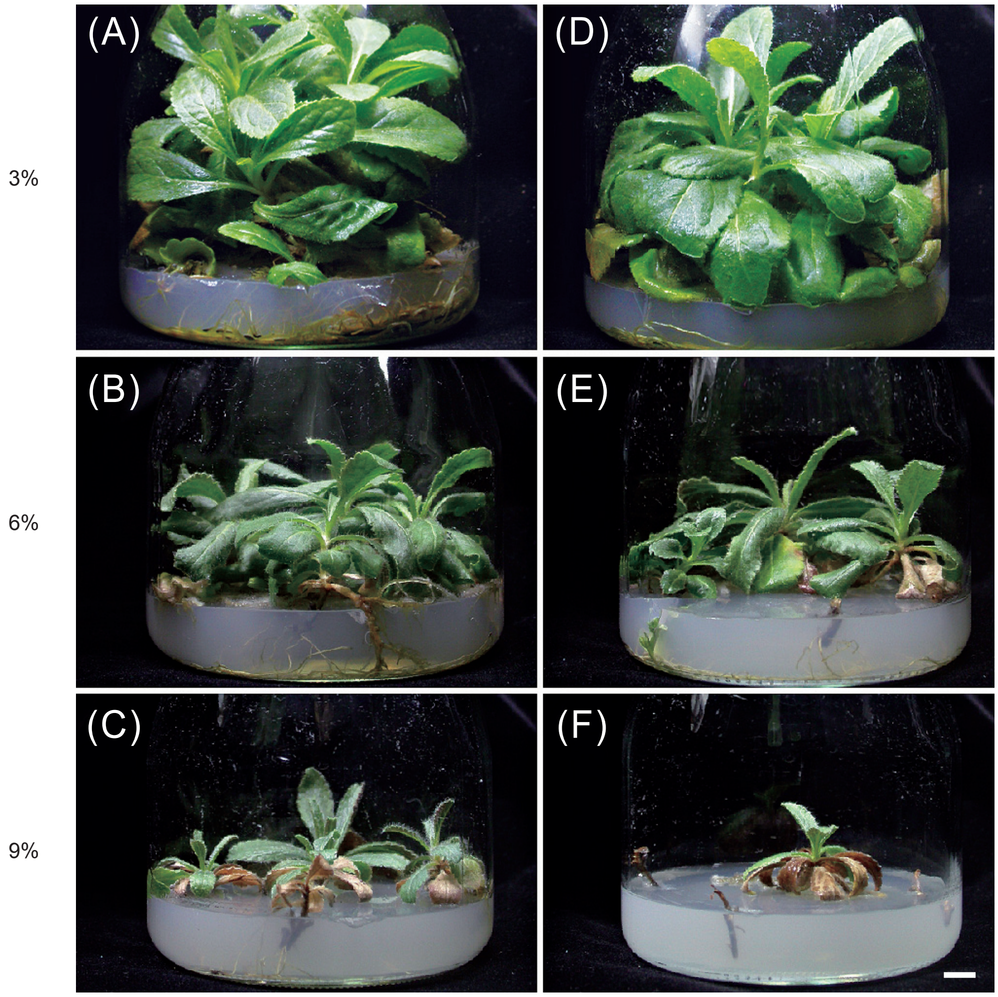

圖 3. 不同蔗糖濃度與莖段培植體對地黃芽體誘導與生長之影響。(A)–(C) 頂芽莖段培植體，蔗糖濃度分別為 3、6 與 9%；(D)–(F) 中間莖段培植體，蔗糖濃度分別為 3、6 與 9% (標尺 = 1 cm)。

Fig. 3. Effect of different stem explants and sucrose concentrations on shoot induction and growth of *Rehmannia glutinosa* Libosch. (A)–(C) Growth of shoot tip explants on medium with 3, 6, and 9% sucrose. (D)–(F) Growth of inter-nodalstem explants on medium with 3, 6, and 9% sucrose (Bar = 1 cm).

(含二次芽體，即從誘導芽體之節位上又誘導出芽體)；中間莖段培植體的芽體誘導率其次，雖於 0.5 mg L^{-1} BA 每 1 培植體最高可誘導出 32.6 個芽，但其因成活率僅達 50%，相較之下，中間莖段培植體的總誘導芽數仍較頂芽莖段為少；基部莖段培植體在 3 種莖段培植體中表現最差，除了接種在不含或較低的 BA 濃度 (0.0–0.25 mg L^{-1}) 培養基中有較高的成活率 (60–100%) 之外，隨著 BA 濃度的提升，培植體存活率下降，當 BA 濃度達 0.5 mg L^{-1} (含) 以上時，成活率只剩 20–40% (表 5)。頂芽培植體在不同濃度 BA 培養基中培養，以 0.5–1.0 mg L^{-1} BA 有較高的芽體增殖效果，每 1 培植體可誘導出最多的芽數。在誘導芽體之根數、長度、葉數、葉長、葉寬與鮮重等性狀方面，除對照組之外，則於 0.125 mg L^{-1} BA 為最佳，中間莖段與莖基部培植體亦有相同的現象，且不同莖段培植體與 BA 濃度處理間具有極顯著交感效應 (表 5、圖 4)。

表 5. 不同莖段培植體與 BA 濃度對地黃芽體誘導與生長之影響。

Table 5. Effects of stem explant types and BA concentrations on shoot induction and growth of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Explant type	BA (mg L^{-1})	Survival (%)	No. of shoot $explant^{-1}$	No. of root $explant^{-1}$	Shoot height (cm)	No. of leaves $explant^{-1}$	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Fresh weight (g)
Shoot tip	0.0	100 a[z]	1.0 e	0.2 cd	9.4 ab	10.4 b	4.4 b	2.0 b	1.6 c
	0.125	100 a	1.8 e	12.2 a	8.9 b	13.8 a	3.8 b	1.8 bc	2.5 b
	0.25	100 a	4.4 e	3.4 ef	5.6 e	6.4 cd	2.9 c	1.1 d	0.4 de
	0.5	90 ab	27.0 bc	1.3 fgh	3.7 f	6.2 cd	1.2 de	0.5 ef	0.1 e
	1.0	80 abc	26.2 c	0.0 h	3.1 fg	5.6 d	1.1 e	1.1 d	0.1 e
Inter-nodal segment	0.0	100 a	1.0 e	9.6 b	9.6 ab	12.2 a	4.4 b	2.1 b	2.1 b
	0.125	100 a	2.4 e	5.2 de	6.5 d	7.8 c	3.0 c	1.0 d	0.8 d
	0.25	80 abc	4.0 e	1.8 fgh	3.5 fg	5.2 d	1.7 d	0.7 e	0.1 e
	0.5	50 de	32.6 a	1.5 fgh	3.2 fg	5.2 d	1.2 de	0.4 ef	0.1 e
	1.0	50 de	30.8 ab	1.0 gh	3.2 fg	5.8 d	1.1 e	0.4 f	0.1 e
Basal-nodal segment	0.0	100 a	1.0 e	8.0 bc	10.0 a	13.5 a	5.8 a	2.7 a	4.3 a
	0.125	70 bcd	1.2 e	8.3 bc	7.6 c	12.6 a	3.7 b	1.6 c	2.5 b
	0.25	60 bcd	4.4 e	2.6 fg	3.1 fg	4.8 d	1.3 de	0.6 ef	0.1 e
	0.5	40 ef	13.0 d	2.0 fgh	3.3 fg	5.4 d	1.5 de	0.5 ef	0.1 e
	1.0	20 f	27.0 bc	1.7 gh	2.7 g	5.6 d	1.0 e	0.4 f	0.1 e
BA		**[y]	**	**	**	**	**	**	**
Explant type		**	**	NS	**	**	*	**	**
BA × Explant type		**	**	**	**	**	**	**	**

[z] Means in the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.
[y] NS, *, **: Non-significant or significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

討論

次氯酸鈉 (漂白水) 為常用的殺菌劑，廣泛應用於建立組織培養無菌培植體時作為殺菌之用。根據研究顯示，次氯酸鈉濃度與消毒時間會影響種子消毒效果，進而影響種子發芽以及存活率。在甜椒種子之消毒試驗顯示，以 0.1% 次氯酸鈉消毒 10 min 有最佳的殺菌與種子發芽效果，汙染率與發芽率分別為 0 與 66.6% (Chao *et al*. 2010)；番茄種子以 4% 次氯酸鈉消毒 10 min，可促進種子發芽，接種於 MS 培養基後 13 d，其發芽率可達 78.1%，消毒效果較使用 HgCl 為佳 (Morla *et al*. 2011)；拖鞋蘭 (*Paphiopedilum wardii* Sumerh) 成熟種子以 0.5% 次氯酸鈉溶液消毒 60 min 或以 1% 濃度消毒 40 min 有最佳除菌的效果，並可提高種子發芽率 (Zeng *et al*. 2012)。本試驗以 0.6% 次氯酸鈉分別處以 10、12、15 與 18 min 消毒時間，其中以 15 min 對地黃種子有最佳之消毒效果及種子發芽率，其污染率與發芽率分別為 5% 與 80%。延長消毒時間至 18 min 雖然可降低的汙染率至 2%，但可能因此造成種子的傷害，反而影響後續之發芽率僅剩 40% (表 1)。地黃種子無菌播種後，除汙染種子外，仍有種子未發芽，可能與消毒液濃度、消毒時與種子成熟度有關。根據上述，甜椒、番茄與拖鞋蘭等種子消毒雖有最適消毒液濃度與消毒時間，但仍對部分種子造成影響而不發芽，本試驗之地黃種子經 0.6% 次氯酸鈉消毒 10 min 即可獲得無菌種子並發芽，但仍有部分種子不發芽。除了種子本身因素影響發芽外，此消毒時間可能已傷害部分種子活性而影響發芽。於蝴蝶蘭 (Tu & Lee 1988) 與萬代蘭 (Mathews & Rao 1980) 的研究顯示，選擇適當成熟度之

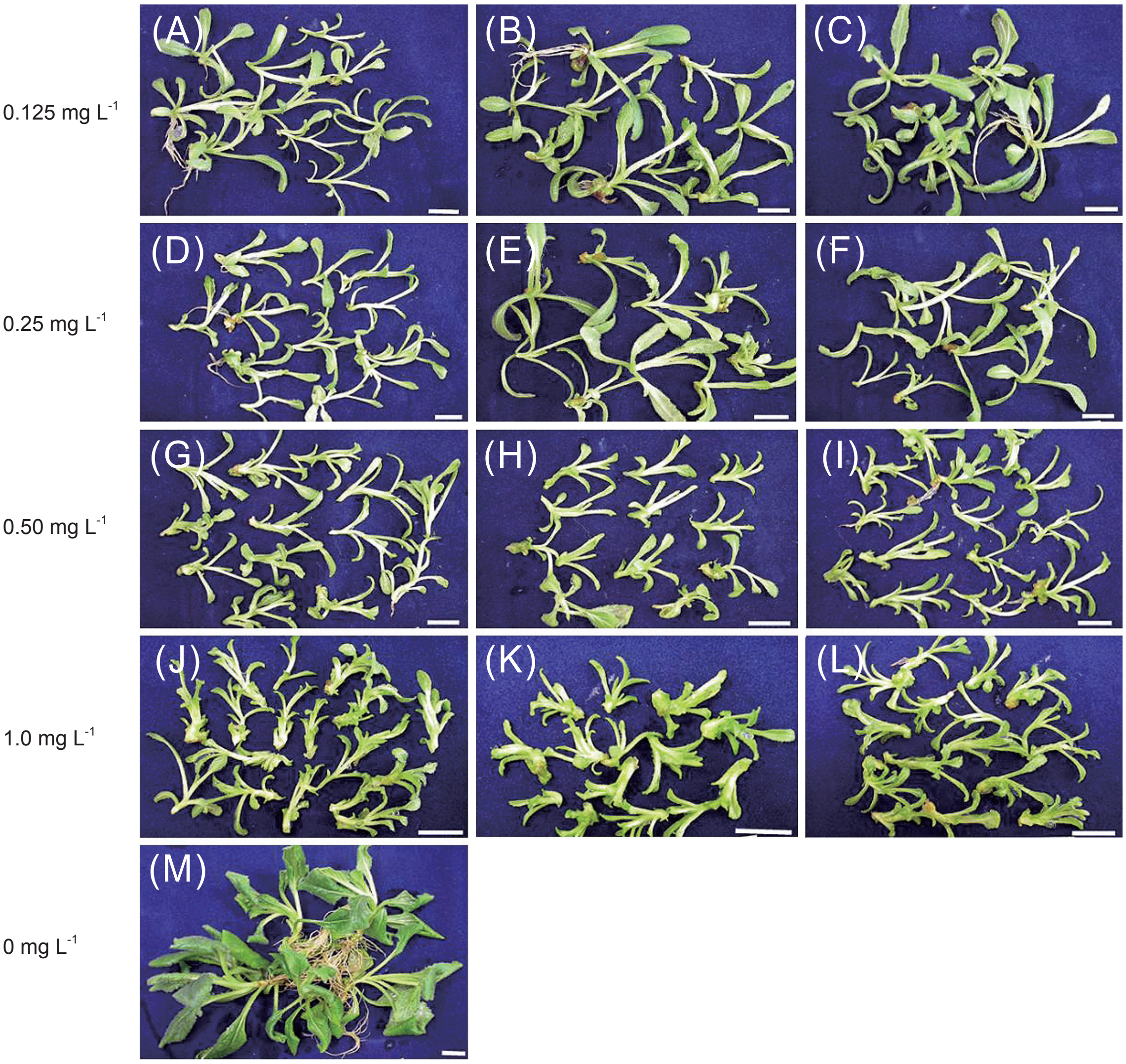

圖 4. 莖段培植體於添加不同 BA 濃度基本培養基所誘導之芽體。(A)–(C) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度 0.125 mg L^{-1} 所誘導之芽體；(D)–(F) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度 0.25 mg L^{-1} 所誘導之芽體；(G)–(I) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度 0.50 mg L^{-1} 所誘導之芽體；(J)–(L) 分別為頂芽、中間與基部莖段培植體於 BA 濃度 1.0 mg L^{-1} 所誘導之芽體；(M) 對照組，頂芽培植體於不含 BA 之基本培養基所誘導之芽體 (標尺 = 1 cm)。

Fig. 4. Stem explants of *Rehmannia glutinosa* Libosch were cultured on the basal medium with various BA concentrations for shoot induction. (A)–(C) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium with 0.125 mg L^{-1} BA; (D)–(F) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium with 0.25 mg L^{-1} BA; (G)–(I) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium with 0.50 mg L^{-1} BA; (J)–(L) Shoot tip, inter-nodal and basal stem segment explants cultured on basal medium 1.0 mg L^{-1} BA; (M) Shoot tip explant cultured on the basal medium without BA (Bar = 1 cm).

果莢或種子的採收時間可獲得最佳之種子發芽率，最高可達 100%。本試驗並未進行地黃種子不同採收時間與成熟度對發芽率之影響，因此仍需更進一步探討。

根據 Chang (2009) 對小葉懸鉤子 (*Rubus taiwanicola* Koidz. & Ohwi) 葉片組織培養的研究顯示，於 16 h 光照、8 h 黑暗環境下，將葉片與葉柄培養於不同種類與濃度之 cytokinin

培養基中，葉片培植體不定芽之誘導效果皆較葉柄培植體為佳，分別為 90% 與 5%，但在癒傷組織誘導率則二者無差異皆為 100%；Park *et al*. (2002) 在蝴蝶蘭的研究顯示，葉片培植體培養於含 88.8 mM BA 及 5.4 mM NAA 之 MS 培養基中，在較低光照強度 10 μmol m^{-2} s^{-1} 下，有最佳之擬原球體 (protocorm-like body; PLB) 誘導率與分化數量，分別為 90% 與 12 PLBs $explant^{-1}$，隨著光照強度提高，培植體存活率、PLB 的誘導率與分化數量皆降低。根據 Chawla (2002) 的研究顯示，培植體於照光環境下培養容易導致培植體切口所分泌之酚類化合物氧化，因此造成培植體與所誘導出之癒傷組織褐化，相反的於黑暗環境下培養則可減少培植體的褐化，而有較高之成活率。Afshari *et al*. (2011) 利用不同光照環境與植物生長調節劑進行油菜 (*Brassica napus* L.) 種子苗癒傷組織誘導的研究顯示，因上胚軸培植體於培養過程產生較少酚類化合物，可適合於光照環境下培養，並促進癒傷組織的誘導與生長。但子葉培植體於光照下易造成所誘導之癒傷組織褐化，因此子葉培植體適合於黑暗中培養，並可促進癒傷組織的發生。本試驗以地黃組培苗之葉片與葉柄作為微體繁殖材料，葉片培植體於照光與黑暗條件下皆容易褐化，僅有少量根分化，雖可誘導出癒傷組織，但無芽體長出。以葉柄培植體配合暗培養以 1.0 mg L^{-1} BA 濃度芽體誘導最佳，為 20% (表 3)。因此，建議採用地黃組培苗之葉柄作為培植體並於黑暗中培養可以有較高之存活率、癒傷組織與芽體誘導率。綜合而言，利用地黃試管苗之葉柄作為微體繁殖培植體材料，施以適當之 (1.0–2.0 mg L^{-1}) BA 濃度於黑暗環境中培養，對於不定芽的誘導效果最好。

糖 (醣) 類在培養基中主要為提供碳源供培植體生長所需，並有調節培養基中滲透壓之功能 (Moncousin 1991)。不同作物之組培苗對蔗糖濃度的耐受性有所不同，根據 Chen *et al*. (2004) 高氏柴胡 (*Bupleurum kaoi* Liu, Chao et Chuang) 組織培養的研究顯示，組培苗成活率在 1.5–12% 蔗糖濃度間並無顯著影響，為 96–100%，但芽體增殖率與發根率仍以較低 (1.5–3%) 蔗糖濃度為佳；Chang & Liaw (2005) 於大蒜 (*Allium sativum* L.) 組織培養試驗中亦顯示蔗糖濃度以 3% 有較佳的成活率；Tu & Lee (1988) 於不同蔗糖濃度 (1–3%) 對蝴蝶蘭 (白花雜交種) (*Phalaenopsis*, white Hybrid) 的無菌播種研究顯示，種子於低蔗糖濃度 (1% & 1.5%) 具有較佳的發芽率及原球體發育。於高蔗糖濃度 (2.5% & 3.0%) 下，不僅發芽差，且易造成原球體之黃化或褐化，蔗糖濃度提高對促進幼苗根部生長影響之程度比莖葉大。Chen *et al*. (2000) 於湖北貝母 (*Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia) 的研究顯示，3% 蔗糖對小鱗莖之根形成具有促進效果最佳，Kumar *et al*. (1999) 於唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus* Hort.) 的研究則顯示，高蔗糖濃度 (0.232 M；約 8%) 較有利組培苗發根。本試驗比較地黃不同莖段培植體於不同蔗糖濃度中對芽體生長之影響，結果顯示蔗糖濃度對於誘導芽數、根數、株高、葉數、葉長、葉寬與鮮重等性狀有顯著差異，但 2 種培植體間並無差異。3 種蔗糖濃度中以 3% 蔗糖對小苗生長最佳，蔗糖濃度提高，對小苗的生長與發育有不良影響，尤其中間莖段培植體於 9% 蔗糖濃度時全數黃化死亡 (表 4)。

蔗糖濃度亦會影響根與塊莖的發育，於馬鈴薯 (*Solanum tuberosum* L.) 試管塊莖的研究顯示，培養基中添加高濃度的蔗糖 (8%) 對塊莖誘導具有良好的促進作用，而且隨著蔗糖濃度的提高，可加速塊莖的形成，高濃度的蔗糖是試管塊莖形成的必要條件 (Khuri & Moorby 1995)。此外，高濃度蔗糖還能誘導塊莖形成過程中特別基因的表達，進而促進塊莖貯藏蛋白的累積 (Zrenner *et al*. 1995; Kuhn *et al*. 2003)。在甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 的研究方面，蔗糖誘導與光合產物累積對甘藷莖、葉和葉柄 *Sporamin* 基因有正調控作用，*Sporamin* 可在葉和葉柄中被大量的表達從而促進甘藷塊根的膨大 (Nakamura *et al*. 1991; Ohta *et al*. 1991; Chen *et al*. 1997)。由於地黃在藥材上主要利用塊根部位，本試驗嘗試以較高濃度 (6–9%) 蔗糖於試管中誘導不定根膨大，試驗結果顯示，地黃試管苗莖段培植體所

誘導長出之芽體於 3、6、9% 三種蔗糖濃度中培養皆無法誘導不定根膨大，而且隨著蔗糖濃度的提升，顯著影響小苗的生長與發育。於蔗糖 9% 時培植體全數褐化死亡，推測不同作物對培養基中蔗糖濃度之耐受度不同，亦或是塊根膨大與塊莖膨大的機制不同而有所差異。

許多組織培養的研究結果顯示，利用瓶苗之不同部位作為培植體，反應不盡相同，此因不同部位培植體具有不同分化能力所致。故選擇適當培植體乃組織培養成功之重要關鍵 (Huang *et al*. 2000; Komalavalli & Rao 2000; Chueh *et al*. 2001)，由台灣龍膽 [*Gentiana davidii* var. *formosana* (Hayata) T. N. Ho] 微體繁殖的研究顯示，以葉片、莖段、莖節與根部作為培植體，其中以莖節之芽體誘導能力最強，平均每個培植體可誘導 6.3 個芽體，而其他培植體則無法誘導芽體形成 (Chueh *et al*. 2001)。組培苗之莖段是作為瓶內繁殖之良好材料，主要是莖部組織上的頂芽或莖節上之腋芽都具有芽體分化之能力。Chen *et al*. (2004) 於高氏柴胡 (*B. kaoi* Liu, Chao et Chuang) 腋芽培養之研究顯示，以瓶苗近頂芽或近基部之莖節作為培植體之芽體誘導率分別為 80% 與 66.7%，每一培植體所誘導芽數分別為 3.3 與 2.6 個芽，近頂芽之培植體其芽體誘導率稍高於基部莖節培植體，但二者並無顯著差異。

在本試驗中利用頂芽莖段、莖中段與基部莖段 3 種不同莖段培植體，雖然芽體之誘導主要受 BA 濃度影響，但仍以頂芽莖段為最佳。主要是頂芽莖段培植體有較高之成活率，提高 BA 濃度雖然在誘導芽體數量方面可獲得良好之效果，但芽體的品質會隨著 BA 濃度的增加而降低 (表 5、圖 4)。因此，建議在芽體增殖的階段可於較高 BA 濃度 (0.5 mg L^{-1}) 下培養，而於出瓶前培養階段可降低 BA 濃度，藉以獲得品質較佳的地黃種苗。

綜合上述試驗結果顯示，以 0.6% 次氯酸鈉溶液消毒地黃種子 15 min 即可獲得良好之除菌效果，具有最低之汙染率與最高之發芽率。以瓶苗之莖段為培植體時以頂芽莖段為最佳，有較高之存活率，培養基中之蔗糖濃度則以 3% 對小苗的生長最為適當。本試驗方法以地黃異花授粉種子探討無菌播種及微體繁殖技術以獲得健康種苗，然而地黃為異花授粉植物，其後代高度分離，此種苗有性繁殖方式雖有可能導致不同植株中活性成分之變異，但可做為選育優質高產新品種進而大量無性繁殖的主要途徑。

誌謝

本研究承本所生技組作物機能研究室鄭統隆前副研究員、賴瑞聲助理研究員以及高瑞隆前助理研究員提供地黃種子與種苗材料協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Afshari, R. T., R. Angoshtari, and S. Kalantari. 2011. Effect of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. Plant Omics J. 4:60–67.

Chang, C. H. and S. I. Liaw. 2005. Effect of growth regulators on the growth of garlic explant. Crop Environ. Bioinform. 2:287–295. (in Chinese with English abstract)

Chang, W. C. 2009. Tissue Culture and the Evalution of Antioxident Activity of *Rubus taiwanicola* Koidz. & Ohwi. Master Thesis, Department of Bioengineering, Tatung University. Taitung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)

Chao, Y. C., S. T. Hsu, and K. C. Tzeng. 2010. Bactericidal efficacy of chlorine dioxide against three seedborne plant pathogenic bacteria and application of seed treatment for eradication of these bacteria. Plant Pathol. Bull. 19:19–29. (in Chinese with English abstract)

Chawla, H. S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. 2nd ed. Science Publishers Inc., Enfield. 528 pp.

Chen, J. C., Y. M. Chen, and K. W. Yeh. 1997. Isolation and characterization of new sporamin gene numbers from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). Taiwania 42:34–42.

Chen, U. C., C. D. Tai, C. C. Chen, and H. S. Tsay. 2000. Study on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia. III. Influence of medium component and light treatment on *in vitro* rooting, and acclimatization of bulblet. J. Agric. Res. China 49:39–47. (in Chinese with English abstract)

Chen, U. C., M. S. Yeh, and H. S. Tsay. 2004. Studies on *in vitro* shoot multiplication of native medicinal

herbs- *Bupleurum kaoi* by axillary bud culture. J. Agric. Res. China 53:27–38. (in Chinese with English abstract)

Chueh, F. S., C. C. Chen, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2001. Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. Planta Med. 67:70–73.

Huang, C. L., M. T. Hsieh, W. C. Hsieh, A. P. Sagare, and H. S. Tsay. 2000. *In vitro* propagation of *Limonium wrightii* (Hance) Ktze. (Plumbaginaceae), an thnomedicinal plant, from shoot-tip, leaf, and inflorescence-node explants. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 36:220–224.

Khuri, S. and J. Moorby. 1995. Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. Ann. Bot. 75:295–303.

Komalavalli, N. and M. V. Rao. 2000. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre*- A multipurpose medical plant. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 61:97–105.

Kuhn, C., M. R. Hajirezaei, A. R. Fernie, U. Roessner-Tunali, T. Czechowski, B. Hirner, and W. B. Frommer. 2003. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. Plant Physiol. 131:102–113.

Kumar, A., A. Sood, L. M. S. Polni, and A. K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat-shock and sucrose on morphogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57:105–112.

Liao, J. Y., C. C. Hu, J. L. Kao, and T. C. Deng. 2007. Identification of *Tobacco mosaic virus* infecting *Rehmannia gultinosa*. Plant Pathol. Bull. 16:61–69. (in Chinese with English abstract)

Mathews, V. H. and P. S. Rao. 1980. *In vitro* multiplication of *Vanda* hybrid through tissue culture technique. Plant Sci. Lett. 17:383–389.

Moncousin, C. H. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusce* (Delaware). HortScience 26:586–589.

Morla, S., C. S. V. Ramachandra Rao, and R. Chakrapani. 2011. Factors affecting seed germination and seedling growth of tomato plants cultured *in vitro* conditions. J. Chem. Biol. Phys. Sci. 1:328–334.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473–491.

Nakamura, K., M. Ohto, N. Yoshida, and K. Nakamura. 1991. Sucrose-induced accumulation of β-amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. Plant Physiol. 96:902–909.

Ohta, S., T. Hattori, and A. Morikami. 1991. High level expression of a sweet potato sporamin gene promoter β-glucuroidas (GUS) fusion gene in the stems of transgenic tobacco plants is conferred by multiple cell type-specific regulatory elements. Mol. Gen. Genet. 225:369–378.

Park, S. Y., H. N. Murthy, and K. Y. Paek. 2002. Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 38:168–172.

Tien, P. 1962. A virus from degenerated *Rehmannia glutinosa* in Honan. Acta Microbiol. Sin. 8:418–419. (in Chinese with English abstract)

Tu, M. C. and N. Lee. 1988. Effect of nitrogen, sucrose concentration and light intensity on seed germination and seedling growth in *Phalaenopsis* white hybrid. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 34:293–302. (in Chinese with English abstract)

Wen, X. S., X. E. Li, and S. L. Yang. 2001. Viral diseases of *Rehmannia glutinosa* and problems demanding prompt solution. Chin. Trad. Herb Drugs. 32:662–664. (in Chinese with English abstract)

Zeng, S., K. Wu, J. A. T. da Silva, J. Zhang, Z. Chen, N. Xia, and J. Duan. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. Sci. Hort. 138:198–209.

Zrenner, R, M. Salanoubat, L. Willmitzer, and U. Sonnewald. 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). Plant J. 7:97–107.

In Vitro Seed Germination and Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch

Chin-Yi Tsao[1], Uei-Chern Chen[1], Tzu-Ying Wu[2], and Chi-Ni Hsia[3,*]

Abstract

Tsao, C. Y., U. C. Chen, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2015. *In vitro* seed germination and micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):177–188.

In vitro studieswere conducted to establish protocol for micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch, an important Chinese herbal medicine. Results showed that seeds disinfection with 0.6% sodium hypochlorite for 15 min significantly reduced the contamination rate to 5% and obtained the highest germination rate to 80%. Comparing the regeneration rate of leaf and petiole explants from *in vitro* grown seedlings revealed that petiole explants growing on MS medium containing 0.01 mg L^{-1} 1-Naphthaleneacetic acid with 2.0 mg L^{-1} Benzyladenine (BA) and cultivated in darkness obtained a better survival rate (62%) along with 10% shoot induction rate and 62% callus induction rate. Cultivating shoot tip and nodal stem segment of *in vitro* grow seedlings on the basal medium containing various sucrose concentrations (3–9%) showed that addition of 3% sucrose had the highest survival rate (100%). Furthermore, shoot tip, inter-nodal and basal nodal stem segments of seedlings were cultured on the basal medium containing 3% sucrose and various BA concentrations (0.0–1.0 mg L^{-1}) to evaluate their regenerative potential. The results showed that shoot tip had the highest survival rate (80–100%) and had the most adventitious shoots induced per explant when cultured on the medium containing 0.5 mg L^{-1} BA. The results show that type of stem segment explants and BA concentration are key factors influence the micorpropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch, Micropropagation, *In vitro* seed germination, Shoot induction.

Received: November 17, 2014; Accepted: January 19, 2015.

[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):189–195 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.03 研究報告

熱泵冷凝乾燥應用研究

黃禮棟[1] 林建志[2,*] 邱相文[2] 蔡致榮[3]

摘要

黃禮棟、林建志、邱相文、蔡致榮。2015。熱泵冷凝乾燥應用研究。台灣農業研究 64(3):189–195。

國際能源價格持續上漲聲中，節能及提升能源效率已成為焦點。熱泵吸取空氣中或水體中的熱能，經過 vapor-compression refrigeration cycle 之蒸發、壓縮、冷凝及膨脹等過程，將熱能由較低處移往較高處，效率高又節能。因此，使用熱泵取代柴油或瓦斯以節省能源支出，已使熱泵成為熱門之工具。熱泵系統運轉時同步產生冷氣及熱氣，因此其能源效率極高，依介質區分型式為空氣對水與水對水 2 種，本研究使用水對水熱泵系統。利用其產生之熱氣乾燥農產品及冷氣凝結乾燥過程中產生的水蒸氣，此乾燥方式可使農產品呈現良好色澤，除了提升乾燥農產品品質外，也提升能源利用效率，為節能減碳的有效利用方式。本所設置完成之熱泵系統冷凝乾燥機，經熱交換器交換後之乾燥熱風溫度可達 65℃，冷水溫度達到 12℃，總能源效率 (COP) 值達到 3.6 以上。

關鍵詞：熱泵、冷凝乾燥、能源效率。

前言

台灣能源 96% 必須仰賴進口，在今日氣候變遷劇烈及石化能源日益枯竭致使燃油價格高漲之情形下，原以燃料油、柴油等做為冬季加溫燃料及乾燥用能源之成本也越來越高。於是，各種節能技術逐一被運用，以提高能源利用效率、降低生產成本兼顧溫室氣體二氧化碳排放減量目的，保護地球環境與生態，而俱高效節能功效之熱泵應用遂成為再生能源中一個重要的研究領域。熱泵 (heat pump; HP) 之作用原理為熱力學之蒸氣壓縮冷凍循環，由壓縮機、冷凝器、膨脹閥與蒸發器等 4 個主要元件以管路連接組成，以冷媒為傳導介質，以產生移動熱能的作用。其原理為藉由輸入電能驅動壓縮機，經環路中冷媒之吸熱、放熱作用，熱能在蒸發器處被吸收，而後於冷凝器處被排出收集，形成移動熱能的效果，達成製冷、製熱目的。經熱交換後之冷、熱氣經風管輸送，可應用於溫室、住家等的加溫或降溫，除節省能源費用支出之外，更因在沒有燃燒的情況下運轉，不會產生二氧化碳及製造多餘廢熱，具有節能、無汙染且運轉費用低之特點。熱泵應用在同時需要冷氣 (或是冷水) 與暖氣 (或是熱水) 的地方，其節能效應更為可觀，像是旅館、飯店、理髮美容、SPA 業者、養殖業、農業、食品加工等，當同時使用冷氣與暖氣時，其總能源效率 (COP) 值可高達 9–11 (Fang 2010)。

農產品乾燥後可延長保存期限並紓解盛產期滯銷與價格暴跌問題，故長期以來業者及農政單位持續研究改進乾燥方法，以期除了乾燥的基本功能外，並能保存農產品的風味、產生良好色澤而又節省能源。冷凝乾燥系統利用到加熱及冷凝兩個子系統，乾燥之農產品除了呈現優良色澤外也因乾燥筒較為封閉，對香氣保

投稿日期：2014 年 8 月 8 日；接受日期：2015 年 1 月 28 日。
* 通訊作者：linjianjhih@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所農業工程組研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所農業工程組助理研究員。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所研究員兼副所長。台灣 台中市。

存十分良好，為目前最佳的乾燥方法之一。Colak & Hepbasli (2009a, 2009b) 研究指出熱泵乾燥系統 (heat pump drying; HPD) 已經行之有年，發展出許多不同種類的 HPD，可以配合各種不同的乾燥產品特性，尤其是熱敏感度高的產品，選擇適合的 HPD 進行乾燥，常應用在乾燥蔬菜、水果以及生物材料上。HPD 不會對環境排放氣體或是廢棄物，是一種環保的加工方式，其優點為擁有較高的能源效率與較佳的產品品質 (Perera & Rahman 1997)。Erbay & Icier (2009) 利用 HPD 配合反應曲面法 (response surface methodology; RSM) 以溫度、風速與乾燥時間做為因子，進行橄欖葉乾燥最佳化試驗，試驗結果發現，橄欖葉乾燥試驗最佳化之設定為：溫度 53.43℃，風速 0.64 m s^{-1}，乾燥時間為 288.32 min。Prasertsan & Saen-saby (1998) 將 HPD、直接火烤乾燥 (direct-fired dryer) 與電熱加熱乾燥 (electrically-heated hot air dryer) 應用在橡木與香蕉的乾燥，結果發現 HPD 較其他兩者所需的操作費用低。本所研究將熱泵產生之熱氣及冷氣經熱交換器交換後設計應用於冷凝乾燥機並試驗其乾燥農產品之效果，並利用 HIOKI-3197 型電力品質分析儀及電子式溫度計等儀器量測計算其效率值。

材料與方法

本研究使用之熱泵冷凝乾燥機 (圖 1) 係由 1 台使用 R134A 環保冷媒及常用工作壓力設定為 24 bar (最大壓力可達 30 bar)，可產生最高溫度為 80 溫熱水之 5 USRT 冰熱雙效 (multi-effect heat pump) 熱泵主機、1 個 500 L 之熱水儲水桶、1 個 300 L 之冷水儲水桶，1 台裝置冷水/冷氣交換器、熱水/熱氣交換器之冷凝乾燥箱體、水閥門、控制電路及冷、熱水管路與馬達等組成。熱泵主機以電壓 220 V 之三相電流輸入電能推動，當啟動後，將熱水桶之水漸漸加熱至預定溫度，一般乾燥使用時由實際使用經驗得知，只需待熱水桶內水溫加熱至高於所需之熱風溫度 5℃，即可經銅管熱交換器產生所需要之熱風，亦即 70℃熱水經熱交換可產生 65℃之熱風供乾燥用。而熱泵加熱之同時，冷水桶之水溫也隨之漸漸降低，可低至 12℃以下。

為探討無乾燥物狀態下乾燥箱內溫溼度的變化及各點溫度之差異，試驗之前先在乾燥箱內擺放 9 個 MicroLog PRO-EC750 溫溼度感測器 (圖 2，其在 -30–90℃範圍內之解析度優於 0.3℃，精確度在 1℃以內)，於調整時間及數據歸零後啟動置入乾燥箱體上層之 4 個角落，

圖 1. 熱泵乾燥系統。

Fig. 1. Heat pump drying system.

圖 2. MicroLog PRO-EC750 及溫度探針。

Fig. 2. MicroLog PRO-EC750 hygrometer and probe.

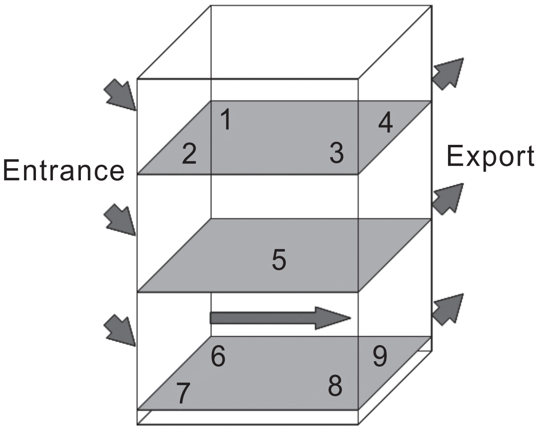

圖 3. 感測器位置示意圖 (面 1、2、6、7 為進風側)。

Fig. 3. Schematic diagram of hygrometer locations (Planes 1, 2, 6, and 7 are the entrances).

中層之中央位置及下層之 4 個角落 (圖 3)。並在控制器上設定其冷熱風之循環方式為加溫達 45℃後，改為冷風降溫至 40℃，再變為熱風模式之循環。本次試驗進行之冷熱風循環 1 次約需 20 min，共進行 3 次約 70 min。

另一次試驗除了量測各參數如熱水溫度、冷水溫度、用電度數 (係利用圖 4 之 HIOKI-3197 電力品質分析儀進行量測) 等參數與時間之變化以換算為總能源效率之外，也利用鮮香菇及厚度約 3 mm 之山藥片 2 種材料試驗乾燥效果。

2011 年 11 月中，於白天室內最高溫 28℃，夜間最低溫 22℃條件下，以熱泵冷凝乾燥機進行山藥薄片乾燥試驗。將熱水溫度設定為 55℃，乾燥箱內溫度由 43℃開始以熱氣循環加溫乾燥，至 52℃後切換成冷氣循環進行冷凝除溼，待溫度降至 43℃時再進行熱氣循環。

鮮香菇之含水率一般為 85–90% 之間，本試驗香菇乾燥方式分為2種：(1) 2段式乾燥法，係以 45℃乾燥 8 h 後，再以 65℃乾燥 9 h；(2) 3 段式乾燥法，係以 40℃乾燥 6 h，再以 55℃乾燥 6 h，最後以 70℃乾燥 5 h。試驗時將鮮香菇 20 kg 均勻分布於層架式乾燥盤上，乾燥之冷熱氣循環交換模式設定為：送熱風至乾燥箱使

圖 4. HIOKI-3197 電力品質分析儀。

Fig. 4. HIOKI-3197 power quality analyzer.

箱內空氣達到預定溫度後，轉為送冷風使乾燥箱降溫至設定溫度，降溫過程同時將乾燥產生之水蒸氣凝結成水滴，之後再通熱風乾燥，如此循環至農產品水分達到含水率 13% 為止。

結果與討論

以 HIOKI-3197 型電力品質分析儀量測記錄用電情形，在大氣溫度 21–22℃之條件下量測之 COP 值，在熱水出水溫度為 30–40℃之範圍時，COP 值為 4.2；40–50℃之範圍，COP 值為 4.0；50–60℃之範圍，COP 值為 3.6 (表 1)，其計算方法為將水加熱升溫所需之熱量 (水質量 × 比熱 × 溫差) 與所使用之電能，經公式 (1)、(2) 及 (3) 等計算而得。

表 1.　熱泵效率測試資料。

Table 1.　Performance data of heat pump coefficients.

Item	30–40℃		40–50℃		50–60℃	
	Hot water temperature (℃)[z]	Electric power (kW)[y]	Hot water temperature (℃)	Electric power (kW)	Hot water temperature (℃)	Electric power (kW)
Time (min)						
0	34.3	4.12	42.3	4.51	51.4	5.51
15	38.0	4.38	48.3	5.22	56.9	6.31
25	42.3	4.51	51.4	5.51	60.8	6.50
COP	4.2		4.0		3.6	

[z] Ambient temperature: 21–22℃.
[y] Power measured with HIOKI-3197 analyzer.

$$COP_h = (Q + W)/W \quad (1)$$

$$COP_c = Q/W \quad (2)$$

COP：熱泵之總能源效率
COP_h：熱泵製熱能源效率
COP_c：熱泵製冷能源效率
Q：水加熱得到之熱能或冷卻移除之熱能
W：熱泵消耗之電能

因此型熱泵應用於冷凝乾燥，所製熱水與冷水均有利用，故此雙效熱泵總能源效率 (COP) 之值可由公式 (1) 與 (2) 之和演算而得，即

$$COP = COP_h + COP_c = 2\ COP_h - 1 \quad (3)$$

由於能源價格攀升，利用熱泵製熱具有更高利因，熱泵之節能效益 (設 COP = 3.6) 與其他熱源之比較經計算後列於表 2 供參考。

圖 5 為空車時乾燥箱內中間層中點溫濕度圖。本次試驗過程熱風冷風循環 3 次，左邊 Y 軸代表溫度 (◆, ℃)；右邊 Y 軸代表濕度 (×, %)；X 軸代表時間 (min)；而兩條直線代表本次試驗所設定的溫度範圍。由表 3 所示之各測點溫度資料得知，乾燥箱內各部位溫度的差異不大，可歸因於乾燥箱內內循環風扇產生擾流之助，故可視乾燥箱內為一均溫均濕的環境。當熱泵乾燥機系統升溫時乾燥箱內濕度會下降；反之，當熱泵乾燥機系統降溫時乾燥箱內濕度會上升。茲將同一時間各測點第 1 個熱冷循環之最高溫與最低溫之資料列於表 3 供參考，其中測點 8 之溫度數據顯示離譜 (有些溫度記錄達 90℃)，推測係溫度探針損壞或轉換電路故障導致，故不予採計。

本系統功能測試完成後進行農產品乾燥測試，以熱泵冷凝乾燥機進行山藥薄片乾燥試驗，經 21 h 將 18.6 kg 含水率 75% 厚度 3 mm 之山藥切片乾燥至含水率 6–8%，且品質與市

表 2.　節能效益。

Table 2.　Energy saving efficiency[z].

Energy source	Energy category	Unit price	Heat content	Energy convert efficiency	Heat NT^{-1}	Heat cost ratio
Electric heat	Electricity	3.6 NT kWh^{-1}	860 kcal kWh^{-1}	95%	226 kcal NT^{-1}	3.78
Natural gas	Natural gas	21.1 NT kg^{-1}	9,000 kcal m^{-3}	90%	384 kcal NT^{-1}	2.27
Diesel burner	Diesel fuel	33.4 NT kg^{-1}	8,800 kcal L^{-1}	85%	224 kcal NT^{-1}	3.82
Oil burner	Fuel oil	23.5 NT L^{-1}	9,200 kcal L^{-1}	85%	333 kcal NT^{-1}	2.57
Heat pump	Electricity	3.6 NT kWh^{-1}	3,098 kcal kWh^{-1}	100%	856 kcal NT^{-1}	1.00
(COP = 3.6)	Off-peak electricity	1.8 NT kWh^{-1}	3,098 kcal kWh^{-1}	100%	1,721 kcal NT^{-1}	0.50

[z] Data source: Website data of National Petroleum Company Limited and Taiwan Power Company, respectively. Visit on 09/02/2012.

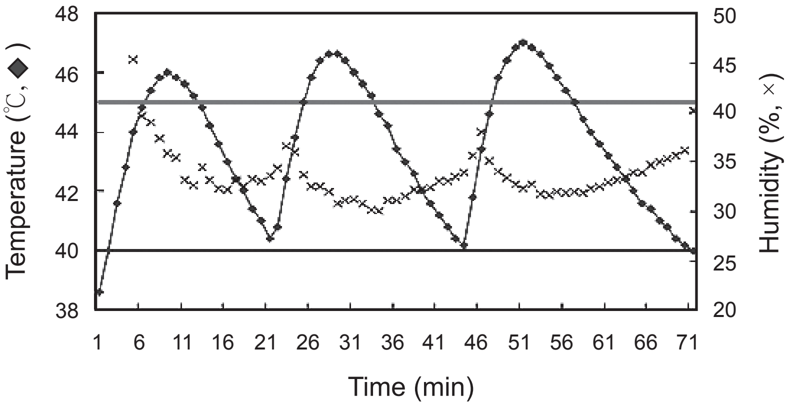

圖 5. 乾燥箱中間層中點 3 次循環溫、濕度變化。

Fig. 5. Temperature and humidity variation in three cycles at mid-point of the drying chamber.

表 3. 第一個循環各測點之最高溫度值及最低溫值。

Table 3. The highest and lowest temperatures at each position of the 1st cycle.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	sd[z]
Highest temperature (℃)	45.6	45.8	45.8	45.2	46.0	45.0	45.2	-	44.6	0.48
Lowest temperature (℃)	40.4	40.2	40.2	40.4	40.4	40.8	40.4	-	41.0	0.28

[z] sd: standard deviation.

售之山藥類似。圖 6 為乾燥之香菇，含水率約為 11–14%，圖中顯示以此乾燥機乾燥之乾菇，無不良之烤焦、過度皺縮等表觀發生。另乾燥產生之水蒸氣經冷風凝結為水滴後匯集於排水槽，可直接排放或以容器收集。

結論

本所設置完成之熱泵系統冷凝乾燥機，經熱交換器交換後之乾燥熱風溫度可達 65℃，冷水溫度亦達到 12℃以下，總能源效率 (COP) 值達到 3.6 以上。一般通熱風乾燥機乾燥香菇，發現乾燥時間不經濟且香味易散失，若改用本系統則可以有效改善香味散失之缺點。利用本系統乾燥之乾菇無不良之烤焦、皺縮過度等表觀發生。另乾燥產生之水蒸氣經冷風凝結為水滴後由排水槽收集，可直接排放或以容器收集。香菇之乾燥方式設定為 2 段式者，以 45℃乾燥 8 h 後，再以 65℃乾燥 9 h；香菇之乾燥方式設定為 3 段式時，以 40℃乾燥 6 h，

圖 6. 乾香菇。

Fig. 6. Dried shiitake mushrooms.

再以 55℃乾燥 6 h，最後以 70℃乾燥 5 h。結果顯示 2 種乾燥方式之乾菇並無明顯之差別，且均無不良之表觀 (烤焦、皺縮過度等) 發生。本乾燥機因為組成零組件較多及需要配管空間等，需要相當面積與空間安裝設置。因熱泵冷凝乾燥機具有良好能源利用效果與乾燥產品品質，若能以較大容量之熱泵應用於個別控制之

並聯乾燥機箱上並依不同乾燥農產品加以個別控制，除提升產品品質外也可發揮較佳節能效益。水溫較高時熱泵效率降低，除與熱力學理論吻合外，亦有研究 CO_2 熱泵者依據其實驗結果擬合出，熱水溫度 t 在 65–95℃之範圍，$COP_h = -0.0325t + 5.632$。而加強管路之絕熱披覆材質保溫效果也能降低熱量逸散，得到較佳能源效率。將乾燥箱內之冷、熱氣循環設定為送熱風以乾燥物品，並使箱內空氣上升達到預定溫度後轉換為送冷風以除去乾燥時產生之水蒸氣，並使溫度降低至設定溫度之循環模式，或者將乾燥倉及冷凝倉分開，同時送出熱風至乾燥倉及送冷風至冷凝倉。而乾燥倉之部分熱風，則抽送至冷凝倉除濕後再循環至乾燥倉。此二方法之優劣，為前者所需空間較小，而後者可直接利用冷凝器散熱之熱空氣及蒸發器吸熱後之冷空氣，減少不同介質之交換，但其技術仍待進一步研究探索。

引用文獻

Colak, N. and A. Hepbasli. 2009a. A review of heat pump drying: Part 1- Systems, models, and studies. Energ. Convers. Manage. 50:2180–2186.

Colak, N. and A. Hepbasli. 2009b. A review of heat-pump drying: Part 2- Application and performance assessments. Energ. Convers. Manage. 50:2187–2199.

Erbay, Z. and F. Icier. 2009. Optimization of drying of olive leaves in a pilot-scale heat pump dryer. Dry Technol. 21:416–427.

Fang, W. 2010. Artificial light with low energy consumption and efficient heat pump technology in agriculture research and development. p.70–76. *in*: Proceedings of the Symposium on Agricultural Engineering and Technologies for Saving Energy and Reducing Carbon Emission. October 27, 2010. Taichung, Taiwan. TARI, Taichung. (in Chinese)

Perera, C. O. and M. S. Rahman. 1997. Heat pump dehumidifier drying of food. Trends Food Sci. Tech. 8:75–79.

Prasertsan, S. and P. Saen-saby. 1998. Heat pump drying of agricultural materials. Dry Technol. 16:235–250.

A Study on Heat Pump Condensation Drying System

Li-Duhng Huarng[1], Jian-Jhih Lin[2,*], Hsiang-Wen Chiu[2], and Jyh-Rong Tsay[3]

Abstract

Huarng, L. D., J. J. Lin, H. W. Chiu, and J. R. Tsay. 2015. A study on heat pump condensation drying system. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):189–195.

As the energy prices continue to hike internationally, energy saving and efficiency improving will become the focal issues. Heat pumps absorb heat in the ambient air or water through the evaporation, compression and expansion process of the Vapor Compression Refrigeration Cycle. It transfers the heat energy in an opposite direction of spontaneous heat flow. The heat pump system is energy efficient and saves a lot of energy. The application of heat pumps has become a hot tool to replace the diesel or gas burner in order to save energy costs effectively. The operation of a heat pump system transfers heat from one place to another. It can provide both heat and cold water simultaneously with proper device. Therefore, it operates with high energy efficiency. According to the source that a heat pump absorbs heat from and the destination it flows heat to, the heat pumps can be categorized into air-water heat pumps and water-water heat pumps. A water-water heat pump system was adopted in this study. The application of its hot air in drying agricultural products and cold air in condensing water vapor generated in the drying process allows agricultural products using this drying method showing good color. In addition to improve the drying quality of agricultural products, it also promotes energy efficiency. It is an effective way to save energy and reduce carbon emission. The heat pump condensing dryer set up in Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) can provide 65℃ hot air for drying through the heat exchanger and the cold water temperature reaches as low as 12℃. The estimated total energy efficiency of the system (COP) is higher than 3.6.

Key words: Heat pump, Condensation drying, Energy efficiency.

Received: August 8, 2014; Accepted: January 28, 2015.
* Corresponding author, e-mail: linjianjhih@tari.gov.tw
1 Research Fellow, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellows, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Deputy Director General, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):196–203 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.04

研究報告

香菇微波冷凝乾燥系統研究

黃禮棟[1]　林建志[2]　邱相文[2,*]

摘要

黃禮棟、林建志、邱相文。2015。香菇微波冷凝乾燥系統研究。台灣農業研究 64(3):196–203。

本研究目的旨在研發一套以時序控制之香菇微波冷凝乾燥系統。利用香菇乾燥特性，配合熱風、微波與冷凝等不同的乾燥方式，在不同的乾燥階段給予不同的乾燥條件，以確保乾燥品質並節省香菇乾燥時間與成本。以本研究開發之微波冷凝乾燥設備進行香菇乾燥試驗，並以香菇之溼基含水率 13% 為目標值。若欲達到此目標含水率，則熱風乾燥溫度設定 50℃時，需作用 24 h，使用電能 89.8 度；加入時序控制後，四段式熱風乾燥須 20 h，消耗電能 74.9 度；若在與熱風乾燥相同操作條件下配合微波技術，則只需 7 h，使用能源為 28.5 度；如果同時使用微波與冷凝技術，亦只需 7 h，使用能源為 78 度。依據試驗結果得知，本計畫所研發具備時序控制功能之微波冷凝乾燥設備，可根據不同乾燥階段，改變乾燥策略，有效控制乾燥品質並節省人力；而微波乾燥比熱風乾燥可節省 7 成以上之乾燥時間。

關鍵詞：香菇、微波、乾燥。

前言

農產品收穫後在貯藏的過程中，常常因為微生物作用、酵素反應、成熟作用或生理病害等，導致農產品變質、腐爛或發霉，使農產品品質下降甚至於不堪食用，造成經濟損失。乾燥的目的在於降低農產品內的含水率，進而抑制微生物及酵素的作用，提高食品貯藏性，並減少農產品重量以增加運輸性。故經過乾燥後的農產品能增加儲藏期限以及運輸的便利性。

進行農產品乾燥時，溫度之控制是影響品質的主要因素之一，香菇對於溫度非常敏感，當乾燥溫度過高時，表面容易變黑 (Argyropoulos *et al.* 2008)。Komanowsky *et al.* (1970) 也提到若乾燥溫度在 83℃以上時會破壞香菇品質。香菇為我國重要食用真菌類作物，由於鮮香菇含有破壞維生素的酵素，在室溫下品質衰退甚快。因此，乾燥香菇可以保有更多的營養成分，延長保存期限與維持良好品質。Song (1993) 及 Du (1989) 指出，烘乾後之香菇含水率以 13% 為最佳。

在香菇乾燥過程中，一般菇農大都依照傳統方法或本身經驗來乾燥香菇。其乾燥方式如台中市霧峰區趙姓農友將香菇置於乾燥箱中，以常溫通風 2 h，然後用 40℃烘 8 h，接著用 50℃再烘 8 h，最後用 60℃烘乾，共約 20 多小時；而台中市中興嶺菇農則視香菇之情況，先做剪菇柄、分級、淋洗及稍晾曬瀝乾表面等處理，接著就以 60℃烘乾，約需 15 h；亦有菇農以 50、60、70 及 85℃各乾燥 3 h 而烘乾者 (Lin 1988)。Lin *et al.* (2010) 也以平行強制送風的方式，以熱風乾燥方式對香菇進行四階段式之乾燥，第一階段為 50℃、第二階段為 55℃及第三階段為 65℃各 6 h，最後以 70℃烘至含水率 13% 以下，共計約 20 h。從以上之資料顯示，無論選用何種乾燥方式，乾燥時間均須18–24 h，除此之外為了兼顧品質，常需要多段式乾燥處

投稿日期：2014 年 8 月 8 日；接受日期：2015 年 1 月 28 日。
* 通訊作者：chiusw@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所農業工程組研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所農業工程組助理研究員。台灣 台中市。

理，造成香菇乾燥成本與人力需求無法降低。

Lai *et al.* (1995) 嘗試以紅外線作為乾燥能源之可行性，雖所需乾燥時間為傳統燃燒燃料乾燥法之 1/3，但所需電費昂貴是該法最大之缺點。微波乾燥是一種能夠迅速的傳熱與傳質的方式，可保持低溫並且快速乾燥產品，結合熱風乾燥將可以大幅減少乾燥時間，優化能源效率和提高產品品質 (Argyropoulos *et al.* 2008)。Drouzas & Schubert (1996) 與 Erle & Schubert (2001) 研究指出，如果能提供合適的控制系統，微波技術可提供高品質的產品、減少營養損失、保留香氣、不變色和自然的外觀。Yonsawatdigul & Gunasekaran (1996) 與 Mujumdar & Law (2010) 利用微波進行試驗，其結果發現使用微波能減少乾燥時間將有益於顏色，多孔性，香氣，收縮及復水程度。Lombraña *et al.* (2010) 研究微波乾燥，以 240 W 火力並行 30 mm Hg 真空方式，溫度維持在 50℃對磨菇進行微波乾燥，與一般熱風乾燥方式相比較，獲得較佳的品質。

微波技術也常應用於食品加工，Wu (2007) 將微波技術應用於咖啡乾燥，結果發現微波功率越高與咖啡豆研磨的越細，乾燥速率越快，越能達到節能減碳的效果。Varith *et al.* (2007) 將微波技術應用在龍眼乾燥，研究將龍眼乾燥過程分成兩個階段，第一階段使用 40℃熱風配合 450 W 的微波作用 1.7 h，第二階段為 60℃熱風配合 300 W 的微波作用 3.3 h，可以得到龍眼最佳的乾燥效率。若是與 65℃的熱風乾燥比較，使用微波的乾燥過程大約減少 64.3% 的乾燥時間與 48.2% 的能源消耗。Sharma & Prasad (2001) 研究發現微波技術可以節省乾燥大蒜所需時間，並維持較佳的產品品質。Wang *et al.* (2004) 將微波技術應用在馬鈴薯乾燥，試驗發現當微波功率越強馬鈴薯質量損失越少、乾燥樣本的切片厚度越薄、脫水率 (dehydration rate) 增加以及減少消耗能源等優點。

本研究的目的為利用微波特性應用於香菇的乾燥作業，結合冷凝技術，發展一套可資利用之加工技術與機械設備，應用於國內香菇之乾燥加工與產品之調製，以期能利用微波乾燥的優點特性來提升香菇乾燥品質，並提升乾燥速率，減少乾燥時間而達到降低生產成本與提高品質的目標。

材料與方法

微波冷凝乾燥系統之開發

微波冷凝乾燥系統主要分成乾燥艙、加熱器、冷凝器、微波發射器、拖盤轉速控制馬達與送風機等 5 個部分。乾燥艙內容積為 440 L，可承受 2 kgf cm^{-2} 壓力，其內部有一托盤轉速馬達，馬達轉軸上有一簡單支架用於承載拖盤 (乾燥盤) 用，並利用頻率的方式控制其轉速，頻率越高轉速越快，上限為 60 Hz。乾燥艙上方加裝兩組微波發射器 (分別稱為微波發射器 A 及微波發射器 B)，兩組微波發射器係利用可程式控制系統進行微波輸出功率 (0–100% 調整) 與發射時間之可程式化調整控制。每組微波發射器功率為 1 kW，頻率為 2,450 MHz；機體後方裝置 1 組三相 220 V、功率 13 kW 之冷凝乾燥系統，機體內部有加熱器、冷凝器 (壓縮機功率為 4 kW) 及送風機 (風速範圍：0–60 m s^{-1})。圖 1 為微波冷凝乾燥系統示意圖，開始時由加熱器產生乾的熱空氣，經由下通風管導入乾燥艙內，進行農產品乾燥作業。之後透過上通風管將濕的冷空氣帶出乾燥艙外並進入冷凝器內，利用冷凝的作用將空氣中含水率降低，使空氣變成乾的冷空氣，再輸送至加熱器內加溫使空氣變成乾的熱空氣進行循環。

微波冷凝乾燥系統自動控制程式之開發

本機之農產品乾燥屬於長時間多段式處理，為便於操作，本研究開發一套配合本設備之自動控制軟體，利用觸控式平板電腦開發人機介面。圖 2 為本研究所開發之微波冷凝乾燥系統人機介面，配合 PLC 以控制本設備其他重要元件，控制項目分成微波發射器 A、微波發射器 B、冷凝系統、熱風溫度、風速以及托盤轉速等 6 項。圖 3 為微波冷凝乾燥系統之自動控制配電盤，左上方有一開關可控制外部電源是否流入電源供應器內並作過負載保護，電源供應器提供控制系統穩定電流使系統能正常作用；右上方有 2 組微波產生器用於產生微波

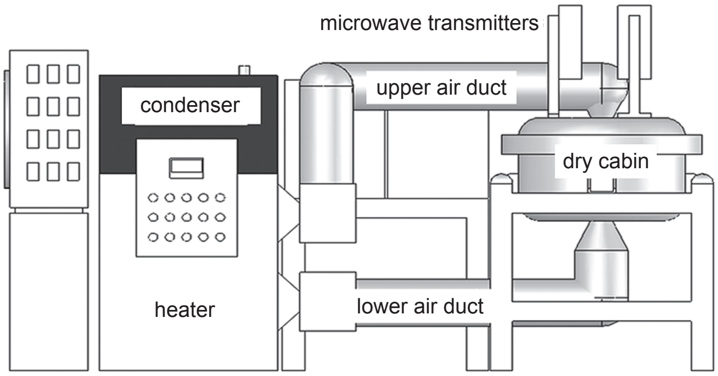

圖 1. 微波冷凝乾燥系統示意圖。

Fig. 1. Schematic diagram of the microwave condensation drying system.

圖 2. 微波冷凝乾燥系統人機介面。

Fig. 2. The man-machine interface of the microwave condensation drying system.

並控制微波功率，PLC 以 Sequential Function Chart (SFC) 方式撰寫程式控制各元件啟動與作用的時間，配合繼電器即可控制其他元件作動。

微波冷凝乾燥系統之功能測試

微波功率分布試驗：微波能源效率試驗，係為了測試乾燥艙內微波功率吸收效率與分布情形。試驗前在乾燥艙內擺放 38 個塑膠容器，每個盛裝溫度 26℃之清水 500 mL，並依序編號，其擺放情形如圖 4 所示。本試驗利用 100% 微波功率，作用時間 10 min 對水進行加熱，計算各部位所吸收的熱量，尋找乾燥艙內各點微波吸收功率的情形，並用於評估本乾燥系統之能源效率。

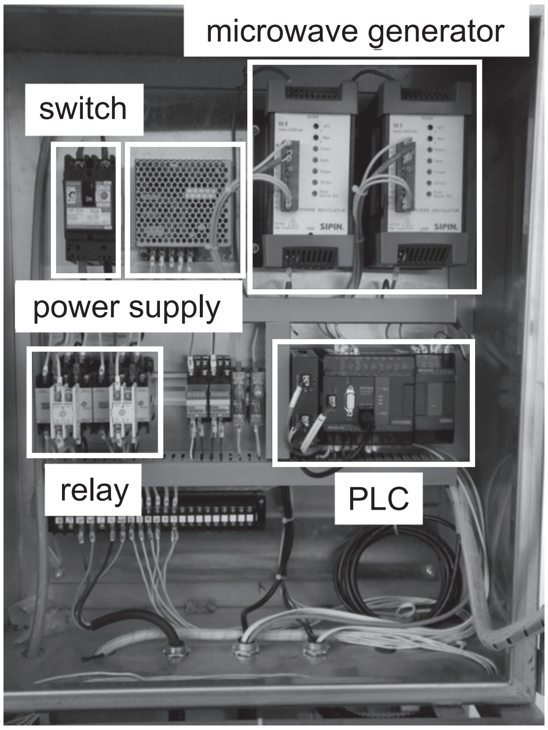

圖 3. 微波冷凝乾燥系統之自動控制配電盤。

Fig. 3. The automatic control switchboard of the microwave condensation drying system.

香菇乾燥試驗：本試驗香菇含水率係以 Denver Instrument 之 Denver IR120 moisture balance 測定，該儀器溫度設定範圍為 40–120℃，可承載最大重量 120 g，含水率精度為 0.01%。量測含水率時乾燥香菇溫度設定為 105℃，儀

圖 4. 乾燥艙內容器擺放情形。

Fig. 4. Containers in the drying chamber.

器每 5 min 會自動記錄數據，直至含水率 (或重量) 恆定為止。

利用 4 種不同乾燥模式對香菇進行乾燥試驗，每次試驗之前對香菇進行淋洗與瀝乾等前處理，完成後以每批次 6 kg 之新鮮香菇平鋪在托盤上進行乾燥試驗。本試驗之乾燥模式分別為定溫熱風乾燥 (熱風溫度設定為 50℃)、四段式熱風乾燥、微波乾燥 (發射微波 10 min 後停止 50 min 之週期循環) 以及微波冷凝乾燥 (發射微波 10 min 後停止，繼之以冷凝 50 min 之循環週期)。試驗中設定之風速為 50 m s^{-1}，完成乾燥之香菇含水率設定為 13%，試驗時一併記錄香菇乾燥至 13% 所需的時間。

四段式熱風乾燥係利用開發之時序控制程式進行階段性自動控制，其控制策略為第一階段以 50℃熱風乾燥 6 h，第二階段 55℃熱風乾燥 6 h，第三階段 65℃熱風乾燥 6 h，第四階段 70℃熱風乾燥至含水率降至 13%。

熱風微波乾燥法係在乾燥過程中，每 1 h 內發射 2 kW 微波功率加熱 10 min 後停止 50 min，而熱風全程供給之模式持續進行，直至香菇含水率降至 13% 為止。於最初加熱之 10 min，菇體因飽含水分 (90% 左右)，依每次 6 kg 鮮菇及微波發射器效率 86% 推估菇體溫度約略上升 45℃。

微波冷凝乾燥係發射微波加熱 10 min 後停止微波，繼而開啟冷凝設備 50 min 以除去乾燥過程蒸發之水分，以如此方式循環直至乾燥完成。

消耗功率與成本：表 1 為乾燥系統之各種乾燥設備消耗功率表，利用表各設備之消耗功率數據、試驗過程中量測數據以及香菇乾燥試驗時間及結果，可得到各種乾燥處理過程消耗之電能，配合台灣電力公司所公布之每度電電費，即可計算各種乾燥過程之乾燥成本。

表 1. 各乾燥設備消耗功率表。

Table 1. Power consumption of each device.

Device	Power (kW)
Hot air heater	3.00
Condenser	5.32
Tray motor	0.75
Microwave heater	1.00

結果與討論

微波冷凝乾燥系統自動控制程式之開發

圖 3 所示為微波冷凝乾燥系統之自動控制配電盤。本設備係利用工業用平板電腦配合 PLC 將控制指令傳送至各作動元件，進行加熱器溫度控制、冷凝器作動、微波發射器功率調整以及托盤轉速控制等。除此之外，尚具備時序控制功能，也就是階段性控制功能，便於進行多階段性的乾燥試驗。

圖 2 為本研究開發之人機介面，主要控制元件有微波發射器 A、微波發射器 B、冷凝、熱風控制以及托盤轉速等 5 項 (真空泵為預留選項，目前無作用)。其中觸控項目之微波發射器 A 及 B 之功能相同，僅控制微波發射功率大小、作用時間以及每小時作動頻率；冷凝觸控可啟動冷凝降溫除濕系統，將乾燥後濕熱空氣降溫，以將空氣中水分冷凝排出系統外；熱風控制為控制乾燥艙內溫度及風速。程式內設有保護機制，即當熱風開啟時，無法起動冷凝功能 (但可以強制解除此功能)；托盤轉速觸控選項可調整乾燥艙內托盤之轉速。

本系統可依據使用者需求，控制各乾燥階段所需的乾燥條件，圖 5 為四階段式時序控制

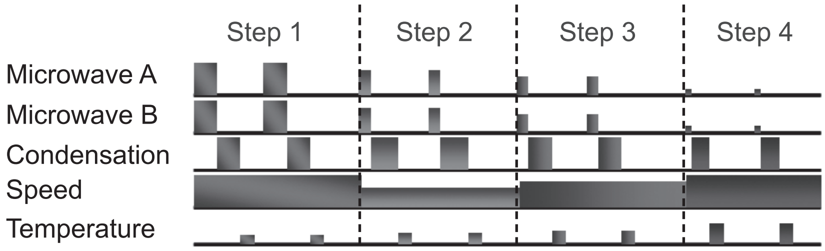

圖 5. 四階段式時序控制示意圖。

Fig. 5. The schematic diagram of the four-stage timing control.

示意圖，X 軸為時間，Y 軸為各元件使用功率大小。乾燥過程中使用者可以根據農產品的特性，擬定乾燥策略，在不同的時間點給予不同的乾燥條件，並對各作動元件下達命令控制其作動與否。

微波功率分布試驗

在乾燥艙內放置 38 個可微波之保鮮盒盛水 500 mL 水溫為 26℃，同時打開微波發射器 A 及 B，以全功率發射 10 min，量測結果中間區域之保鮮盒比周圍溫度平均高出 3.4℃，換算成熱量為 38.48 kcal h^{-1}，也就是說乾燥艙中間接收的功率比兩旁高出 38.48 kcal h^{-1}；另計算 38 個保鮮盒內水吸收的熱量，換算成系統微波加熱效率約為 86%。

香菇乾燥試驗

本試驗使用之香菇含水率平均在 92% 左右，對照組之熱風乾燥條件為熱風溫度 50℃，風速 50 m s^{-1}，使香菇含水率降至 13%。在相同的風速條件下分別以四段式熱風乾燥、熱風微波乾燥、熱風微波冷凝乾燥進行比較，其結果顯示於圖 6，其中 X 軸為時間 (h)，Y 軸為香菇含水率 (%)，圖 6 中各時間點之上圖為菇傘、下圖為菇柄之各處理含水率。由圖 6 可知，菇柄含水率皆高於菇傘含水率，代表菇柄較菇傘不易乾燥。

依據圖 6 得知，以熱風乾燥之香菇在 24 h 後含水率降至 13%；以 4 段式熱風乾燥之香菇在 20 h 後含水率降至 13%；以熱風微波乾燥以及熱風微波冷凝乾燥之香菇在 7 h 後即使含水率降至 13% 以下。圖 7 為各方式乾燥後之香菇情形，其品質是由菇傘與菇柄顏色作為判斷標準，以黃褐色品質為佳。由圖可知，熱風乾燥與四段式熱風乾燥的香菇品質較佳，其次為熱風微波冷凝乾燥，熱風微波乾燥之香菇品質最差。

使用能源與成本

消耗能源係依據香菇乾燥試驗後所得結果，配合表 1 各設備之消耗功率與乾燥時間計算所得。當香菇含水率降至 13% 時，熱風乾燥需要 24 h，消耗電能為電熱管與托盤馬達之功率和 3.746 kW 乘以使用時間 24 h 之積，即 89.8 度，所需成本為新台幣 88.6 元 kg^{-1}；四段式熱風乾燥需要 20 h，使用電熱管與托盤馬達之功率和為 3.746 kW，故消耗能源 74.92 度，所需成本約為新台幣 73.9 元 kg^{-1}；熱風微波乾燥需要 7 h，消耗能源 28.5 度，所需成本約為新台幣 28.1 元 kg^{-1}；熱風、微波及冷凝同時作用乾燥需要 7 h，消耗能源 78.0 度，所需成本約為新台幣 77.0元 kg^{-1}。表 2 列出各處理過程的作用時間、消耗功率與成本分析結果。電費是以營業用電夏月最高單價新台幣 5.92 元 度$^{-1}$ (kWh) 及每 kg 鮮香菇重作為計算基準。

結論

微波加熱為利用微波場使極性分子之偶極距隨著電磁場的高速振動而快速旋轉，造成分子摩擦而產生熱能被分子吸收的快速升溫，係直接以輻射方式傳遞微波能量而不必經過對流傳導過程。不僅可快速加熱，同時也可減少因傳導所導致的能量損失，因此相較於傳統加熱法，微波加熱法可以明顯大幅地縮短反應時間。利用微波加熱原理應用於農產品乾燥不但

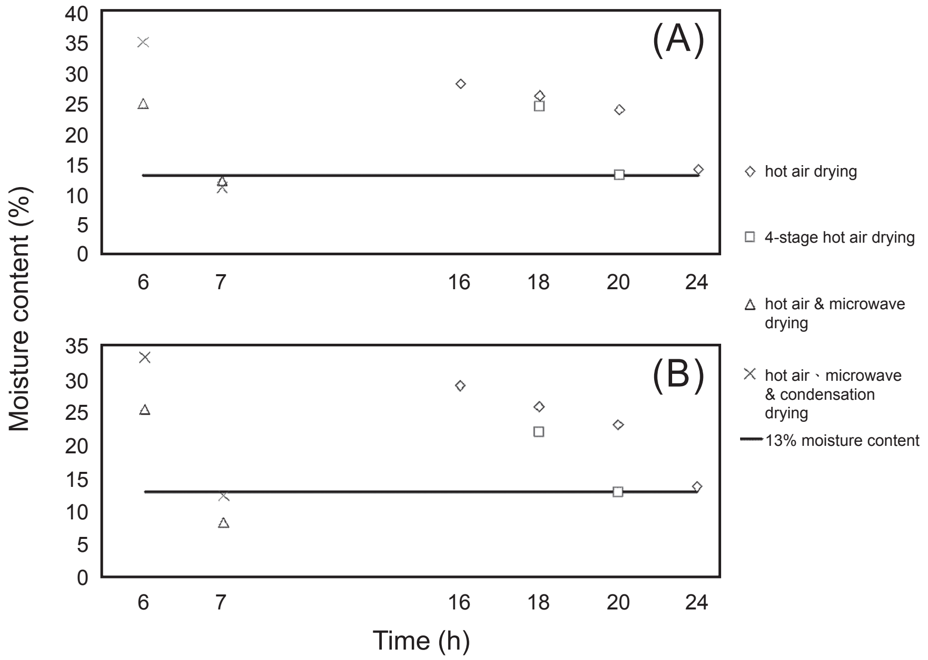

圖 6. 各乾燥過程含水率由約 35% 降至 13% 所需時間。(A) 菇傘；(B) 菇柄。

Fig. 6. Time required of each drying process from around 35% to 13% moisture content. (A) Mushroom cap; (B) Mushroom stem.

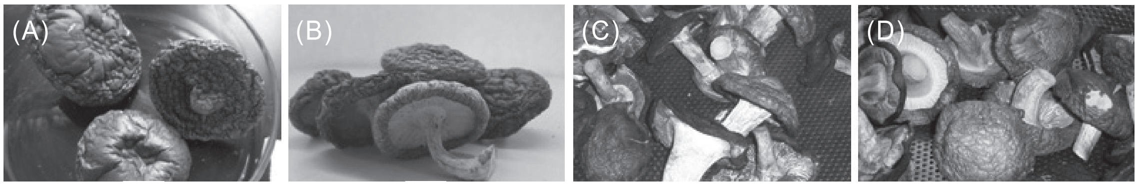

圖 7. 乾燥後香菇。(A) 熱風乾燥；(B) 四段式熱風乾燥；(C) 熱風微波乾燥；(D) 熱風微波冷凝乾燥。

Fig. 7. The dried shiitake mushroom appearance: (A) Hot air drying; (B) Four-stage hot air drying; (C) Hot air microwave drying; and (D) Hot air microwave condensation drying.

表 2. 各處理過程的作用時間、消耗能源與成本。

Table 2. Time, energy and unit cost of different drying method.

Drying method	Time (h)	Energy (kWh)	Unit cost (NT kg^{-1})
Hot air drying	24	89.8	88.6
Four-stage hot air drying	20	74.9	73.9
Hot air microwave drying	7	28.5	28.1
Hot air microwave condensation drying	7	78.0	77.0

可縮短反應時間，達到節省能源的目的，通常也可將產率提高、減少副產物、並降低傳統加熱法對環境所產生的衝擊，因此微波技術為一種結合高速率、高產率、高選擇性及綠色能源的新科技應用領域。由於傳統香菇乾燥方式耗費過多加熱時程，造成國產香菇調製成本居高

不下，造成強大的進口香菇競爭壓力。因此，本研究開發成果的揭露，可適時為國內香菇乾燥加工提供一項新的利器。

本所研發之微波冷凝乾燥設備，具備時序控制功能，可根據不同乾燥期程，設定乾燥參數，以 PT-100 溫度感測器量測乾燥艙出風口溫度，以得到即時艙內溫度，有效控管品質並節省人力。乾燥艙整體微波吸收功率約為 86%，中間部分吸收之功率比兩旁高出 38.48 kcal h^{-1}，使得中間部分之香菇比兩旁容易焦黑(過度乾燥)。

香菇乾燥試驗中發現，微波乾燥比熱風乾燥節省 7 成以上之作業時間及降低 7 成成本左右，然而乾燥品質較差，其原因為微波乾燥較熱風乾燥難以控制乾燥溫度，常使香菇過度乾燥，導致部分香菇品質下降。以研究乾燥各階段微波作用時間及停止時間長短與比例之試驗以得到最佳乾燥品質之模式將為下一步研究目標。利用於其他高單價農產品，如冬蟲夏草菌絲體、紅花、薑黃等中草藥之乾燥調製，為此乾燥機之重要研究應用標的。

誌謝

本計畫由行政院農業委員會農業試驗所 2011–2013 年度科技計畫經費支持，謹致謝忱。

引用文獻

Argyropoulos, D., A. Heindl, and J. Müller. 2008. Evaluation of processing parameters for hot-air drying to obtain high quality dried mushrooms in the Mediterranean region. http://www.tropentag.de/2008/abstracts/full/355.pdf (visit on 3/18/2014)

Drouzas, A. E. and H. Schubert. 1996. Microwave application in vacuum drying of fruits. J. Food Eng. 28:203–209.

Du, Z. J. 1989. Edible Mushroom Cultivation Techniques. 6th ed. Harvest Farm. Taipei. 183 pp. (in Chinese)

Erle, U. and H. Schubert. 2001. Combined osmotic and microwave-vacuum dehydration of apples and strawberries. J. Food Eng. 49:193–199.

Komanowsky, M., F. B. Talley, and R. K. Eskew. 1970. Air drying of cultivated mushrooms. Food Technol. 24:1020–1024.

Lai, C. C., T. H. Chou, and L. S. Liang. 1995. Infrared drying of Shiitake mushroom and the development of a data acquisition and control system. J. Agric. Res. China 44:464–469. (in Chinese with English abstract)

Lin, S. Y. 1988. Studies on the Characteristics of Taste-Active Components in Shiitake Mushroom and the Powderization of Its Concentrate. Master thesis, Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 65 pp. (in Chinese with English abstract)

Lin, W. L., S. A. Yang, and C. H. Hung. 2010. The effect of different storage temperature and days on the color and quality of dried shiitake. Fung. Sci. 25:33–47.

Lombraña, J. I., R. Rodríguez, and U. Ruiz. 2010. Microwave-drying of sliced mushroom. Analysis of temperature control and pressure. Innov. Food Sci. Emerg. 11:652–660.

Mujumdar, A. S. and C. L. Law. 2010. Drying technology: Trends and applications in postharvest processing. Food Bioprocess Technol. 3:843–852.

Sharma, G. P. and S. Prasad. 2001. Drying of garlic (*Allium sativum*) cloves by microwave-hot air combination. J. Food Eng. 50:99–105.

Song, S. F. 1993. Sawdust Plastic Bag Mushroom Cultivation. Council of Agriculture & Taiwan Provincial Agriculture and Forestry Department. Taichung, Taiwan. 39 pp. (in Chinese)

Varith, J., P. Dijkanarukkul, A. Achariyaviriya, and S. Achariyaviriya. 2007. Combined microwave-hot air drying of peeled longan. J. Food Eng. 81:459–468.

Wang, J., Y. S. Xiong, and Y. Yu. 2004. Microwave drying characteristics of potato and the effect of different microwave powers on the dried quality of potato. Eur. Food Res. Technol. 219:500–506.

Wu, W. W. 2007. Study of Coffee Drying by Microwave Method. Master thesis, Department of Chemical Engineering, Feng Chia University. Taichung, Taiwan. 94 pp. (in Chinese with English abstract)

Yonsawatdigul, J. and S. Gunasekaran. 1996. Microwave-vacuum drying of cranberries: Part II. Quality evaluation. J. Food Process. Preserv. 20:145–156.

A Study on Microwave Condensation Drying of Shiitake Mushroom

Li-Duhng Huarng[1], Jian-Jhih Lin[2], and Hsiang-Wen Chiu[2,*]

Abstract

Huarng, L. D., J. J. Lin, and H. W. Chiu. 2015. A study on microwave condensation drying of shiitake mushroom. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):196–203.

The purpose of this study was to establish a sequence controlled microwave condensation drying system for shiitake mushroom drying. The utilization of hot air, microwave and/or condensation drying method in different drying periods coordinated with the drying characteristics of the shiitake mushroom will ensure the drying quality of the product as well as time saving and cost. The drying experiment of the microwave condensation dryer with only the hot air set at 50℃ took 24 h to bring moisture level down to 13% and consumed 89.8 kWh electric power. If the sequence control was implemented, the four-stage hot air drying took 20 h to dry the shiitake mushroom to 13% moisture content and consumed 74.9 kWh electric power. If the hot air was set at 50℃ with the microwave, the drying time was reduced to 7 h and consumed 28.5 kWh electric power. If the 50℃ hot air accompanied by microwave and condensation, the drying time was 7 h but the electric energy consumption was 74.9 kWh. The experiment showed that the sequence controlled microwave condensation dryer developed in the research could adjust shiitake mushroom drying strategy in different drying periods to maintain the product quality and save the labor cost and drying time up to 70%.

Key words: Shiitake mushroom, Microwave, Drying.

Received: August 8, 2014; Accepted: January 28, 2015.

* Corresponding author, e-mail: chiusw@tari.gov.tw

1 Research Fellow, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Assistant Research Fellows, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):204–212 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.05 研究報告

使用即時定量 RT-PCR 於瓜類褪綠黃化病毒檢驗之評估

關政平 [1,*] 林育昌 [2] 曾清山 [1] 鄭櫻慧 [3] 鄧汀欽 [4]

摘要

關政平、林育昌、曾清山、鄭櫻慧、鄧汀欽。2015。使用即時定量 RT-PCR 於瓜類褪綠黃化病毒檢驗之評估。台灣農業研究 64(3):204–212。

本研究依據瓜類褪綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV) 之鞘蛋白 (coat protein) 基因設計專一性引子對，並利用 real-time RT-PCR 與 TaqMan 螢光探針，建立瓜類褪綠黃化病毒的檢測技術，同時進行田間洋香瓜和南瓜是否感染 CCYV 之測試。結果顯示，本研究所開發之 real-time RT-PCR 檢測方法的靈敏度，相較於一般 RT-PCR 提高約 100–1,000 倍，並可在感病洋香瓜和南瓜上專一性的偵測到 CCYV，與其他瓜類病毒及健康之植株並無反應。本檢測方法亦運用於分析田間感染 CCYV 洋香瓜試驗。此 real-time RT-PCR 具有專一性佳及靈敏度高之優點，未來可將本技術應用於評估瓜類作物是否感染 CCYV。

關鍵詞：瓜類褪綠黃化病毒、分子偵測、及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應。

前言

瓜類退綠黃化病毒 (*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV) 為 *Closteroviridae* 科，Crinivirus 屬之長絲狀病毒，基因體由兩條正單股 RNA 所組成，分別命名為 RNA1 及 RNA2。2004 年首次發現於日本，並確認其分類地位 (Ueda *et al*. 2006; Gyoutoku *et al*. 2009; Okuda *et al*. 2010)。其後在中國、蘇丹等地皆有發現的記錄 (Gu *et al*. 2011; Hamed *et al*. 2011; Zeng *et al*. 2011)。台灣則在 2009 年於雲林發現洋香瓜感染 CCYV (Huang *et al*. 2010)。CCYV 病毒可藉煙草粉蝨以半永續性方式傳播，危害多種作物。宿主範圍包括甜瓜、胡瓜、南瓜、西瓜等葫蘆科作物 (Wisler *et al*. 1998a; Wisler *et al*. 1998b; Gyoutoku *et al*. 2009)。感染初期植株葉片產生小型黃斑，病斑逐漸擴大形成綠色嵌紋病徵，影響果實產量與品質 (Gyoutoku *et al*. 2009)。目前根據血清免疫學所發展之酵連抗體免疫標誌法 (the enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) (Dietzgen & Thomas 1991; Kubota *et al*. 2011)，及反轉錄聚合酵素鏈鎖反應法 (RT-PCR) (Gyoutoku *et al*. 2009) 等已被廣泛應用於檢測植物 RNA 病毒。

本篇研究目的主要是利用 CCYV 鞘蛋白 (coat protein; CP) 基因設計專一性核酸探針，並於其兩端標定螢光物質，以便應用 TaqMan 及時反轉錄聚合酶鏈鎖反應反應 (real-time RT-PCR) 建立快速檢測技術，並探討檢測專一性與靈敏度及檢測樣品是否帶有 CCYV 病毒。

材料與方法

病毒來源

由台中地區洋香瓜田收集疑似感染 CCYV 植株，經 RT-PCR 及定序方法確認為病毒感

投稿日期：2014 年 11 月 18 日；接受日期：2015 年 2 月 11 日。
[*] 通訊作者：pcr123@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

染後，使用磷酸鉀緩衝液 (0.05 M, pH 7.5) 研磨均質後，經汁液接種於藜藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 單斑分離及增殖於矮南瓜。其餘使用之對照病毒，包括 CMV (*Cucumber mosaic virus*)、CGMMV (*Cucumber green mottle mosaic virus*)、PRSV-W (*Papaya ringspot virus*-W)、ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) 病毒分離株皆為行政院農業委員會農業試驗所保存。

植株全 RNA 的抽取純化

取 0.1 g 新鮮葉片或 0.05 g 冷凍乾燥葉片，置於液態氮中研磨，並參照廠商所提供之操作手冊以 TriSolution Reagent Plus (GeneMark, Taiwan) 抽取全 RNA，抽取完成的全 RNA 保存於 -80℃待後續試驗使用。

Real-time RT-PCR 引子的設計

Real-time RT-PCR 引子是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 軟體所設計，核酸引子合成則是委託 Bio Basic 公司 (Bio Basic Inc., Canana) 所合成。引子 (CCYV-cp-Q0330-117-F/R，如表 1 所示) 專一性結合於 CCYV RNA2 的 *CP* 基因序列 (GeneBank accessionsAB523789)，結合的序列位置分別為第 5,447–5,469 及 5,545–5,563 個核苷酸，產物預期為 117 bp。此段 RT-PCR 擴增序列包含專一性螢光探針 CCYV-0510-probe 表 1 的結合序列，以確保核酸擴增時，專一性螢光探針因聚合酶分解而產生螢光，以利 real-time RT-PCR 機器偵測螢光訊號。

TaqMan 螢光探針的設計

TaqMan 螢光探針序列 CCYV-0510-probe (表 1) 是藉由 Primer Express™ (Applied Biosystems) 軟體所設計，並委託 Biosearch Technologies (Novato, CA, USA) 合成。可專一性結合於 CCYV RNA2 的 *CP* 基因序列 (GeneBank accessions numberAB523789)，結合的序列位置為第 5,487–5,508 個核苷酸。其 5' 和 3' 端分別標定螢光物質 FAM (6-carboxy fluorescein excitation wavelength = 494 nm) 及 BHQ1 (excitation wavelength = 534 nm)。

建立 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方法

本試驗所使用的 RT-PCR 藥劑為 AccessQuick RT-PCR System (Promega, Madison, WI, USA)，反應物包括 AccessQuick Master Mix (2×) 12.5 μL、0.1 μM CCYV-cp-Q0330-117-F/RCCYV-cp-Q0330-117-R 引子、2 μL 植物全 RNA 反應體積為 25 μL。反應條件為：45℃ 45 min、95℃ 3 min、40 個循環的 95℃ 30 s、52℃ 30 s 和 72℃ 30 s，72℃ 5 min 和 16℃ 定溫。Real-time RT-PCR 所使用的試劑套組為 KAPA PROBE FAST Universal One-Step real-time RT-PCR Kit (KAPA BIOSYSTEM, Woburn, MA, USA)。在 20 uL 的反應體積中，加入的反應物分別為：KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2×) 10 μL、0.1 μM CCYV-cp-Q0330-117-F/CCYV-cp-Q0330-117-R、0.75 μM CCYV-0510-probe、dUTP (10 mM) 0.4 μL、ROX Low (50×) 0.4 μL、KAPA RT Mix (50×) 0.4 μL、2 μL 植物全 RNA。反應條件為：42℃ 5 min、95℃ 3 min，40 個循環的 95℃ 3 s、52℃ 30 s 和 60℃ 33 s。Real-time RT-PCR 反應偵測機器為 ABI PRISM® 7500

表 1. 本試驗所使用之核酸引子與核酸探針。

Table 1. The primers and fluorescent nucleic acid probes used in this experiment.

Primer/Probe name	Sequence (5'–3')	Tm (℃)	Primer location[z]	Primer size (bp)
CCYV-cp-Q0330-117-F	GTCAGATATTGAAATTCTTAAAG	52	5,447–5,469	23
CCYV-cp-Q0330-117-R	GAACCATTAACGTAATCAG	52	5,545–5,563	19
CCYV-0510-probe	FAM-AGCGACCATCATCTACAGGCAA-BHQ1[y]	58	5,487–5,508	22

[z] Primer location based on GenBank Accession number: AB523789.

[y] FAM: the 5'-end of probe was labeled with 6-carboxy-fuorescein; BHQ1: the 3'-end of the probe was labeled with Black Hole Quencher-1.

Sequence Detection System (Applied Biosystems USA)。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 的專一性測定

為確定所設計的引子和探針序列是否對 CCYV 序列具專一性，以 3 組健康植株 (洋香瓜、西瓜、南瓜) 和 5 組感染不同病毒植株 (CGMMV、CMV、PRSV、ZYMV 和 CCYV) 所抽取的全 RNA 進行 RT-PCR 以及 real-time RT-PCR 反應，其反應物及條件如前述。

CCYV 靈敏度檢測試驗

為測定所設計的探針發展之 real-time PCR 對 CCYV 病毒檢測的靈敏度，本研究應用胞外轉錄 (*in vitro* transcription) 技術製備 CCYV 之 CP RNA 將 CCYV 所感染的病株全 RNA，以 CCYV-cp-753-F (5'-ATGGAGAAGACTGACAATAAACAAA-3') 和 CCYV-cp-753-R (5'-TTATTTACTACAACCTCCCGGTG-3') 引子進行 PCR 反應，反應條件為：95℃ 3 min、40 個循環的 95℃ 30 s、55℃ 30 s 和 72℃ 30 s，72℃ 5 min 和 16℃定溫，將所擴增的片段選殖於載體 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA)，並轉型於 *Escherichia coli* JM 109 (Promega, Madison, WI, USA) 重組載體 DNA 以 Gene-Spin DNA extraction kit (波仕特，台灣) 抽取純化，再以 T7 RNA 聚合酵素 (Promega, Madison, WI, USA) 進行胞外轉錄反應，依照 RiboMax large-scale RNA production system (Promega, Madison, WI, USA) 建議操作，反應物經 DNase I 處理後，最後以 RNA 純化套組純化 RNA 並且溶解於 DEPC 水。將經由胞外轉錄技術製備 CCYV CP RNA 片段以 10 倍序列稀釋，由 100 ng μL^{-1} (相當於 9.8×10^{10} copy 數) 稀釋至 9.8×10^{-1} copy 數和 NTC (No Template Control)，另外也以 CCYV 感染植株之全 RNA 做偵測，植物全 RNA 之純化，RT-PCR 及 real-time RT-PCR 反應條件悉如前述。

田間植株的 CCYV 病毒檢測

採集田間植株洋香瓜 (18 個) 和南瓜 (11 個) 植株材料，取葉片組織約 0.1 g，植物全 RNA 的抽取純化，及以 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 進行 CCYV 病毒檢測均依照前面所述步驟。

結果

CCYV 引子對和探針的設計及其專一性測定

為設計可專一性檢測 CCYV 病毒的核酸引子對和探針，本試驗比對 CCYV 病毒序列，利用 CCYV RNA2 的 *CP* 基因高保留區段設計了引子 CCYV-cp-Q0330-117-F 及 CCYV-cp-Q0330-117-R 和探針 CCYV-0510-probe (表 1)。

RT-PCR 和 real-time RT-PCR 於 CCYV 的專一性測定

為確定這些引子對和探針對 CCYV 是否具專一性，我們以 RT-PCR 方法，分別針對健康洋香瓜、健康南瓜、CMV 感染洋香瓜植株、CGMMV 感染洋香瓜植株、PRSV-W 感染洋香瓜植株、ZYMV 感染洋香瓜植株、CCYV 感染洋香瓜植株 (CCYV-1) 和 CCYV 感染南瓜植株 (CCYV-2) 的全 RNA 進行 RT-PCR 反應，並含未添加植物 RNA 的反應 (NTC) 作為負對照組。瓊脂凝膠電泳分析顯示，僅 CCYV 感染的洋香瓜植株 (CCYV-1) 和南瓜植株 (CCYV-2) 這兩組產生 117 bp 產物之核酸片段，對其他瓜類病毒如 CMV、CGMMV、PRSV-W、ZYMV 感染之植株及健康的洋香瓜與南瓜，與作為負對照組一樣皆無擴增產物 (如圖 1A)，顯示本試驗設計的引子具有專一性。再以 real-time RT-PCR 方法進行試驗，結果顯示只有在 CCYV 感染洋香瓜或南瓜之組織呈現正反應 (圖 1B)，Ct 值為 21.9 及 23.0，而被其他瓜類病毒如 CMV、CGMMV、PRSV、ZYMV 感染之植株，及健康的洋香瓜與南瓜，與負對照組類似皆無反應。經由上述試驗顯示，所設計的引子和探針於 real-time RT-PCR 方法試驗，皆對 CCYV 病毒基因片段具有專一性。

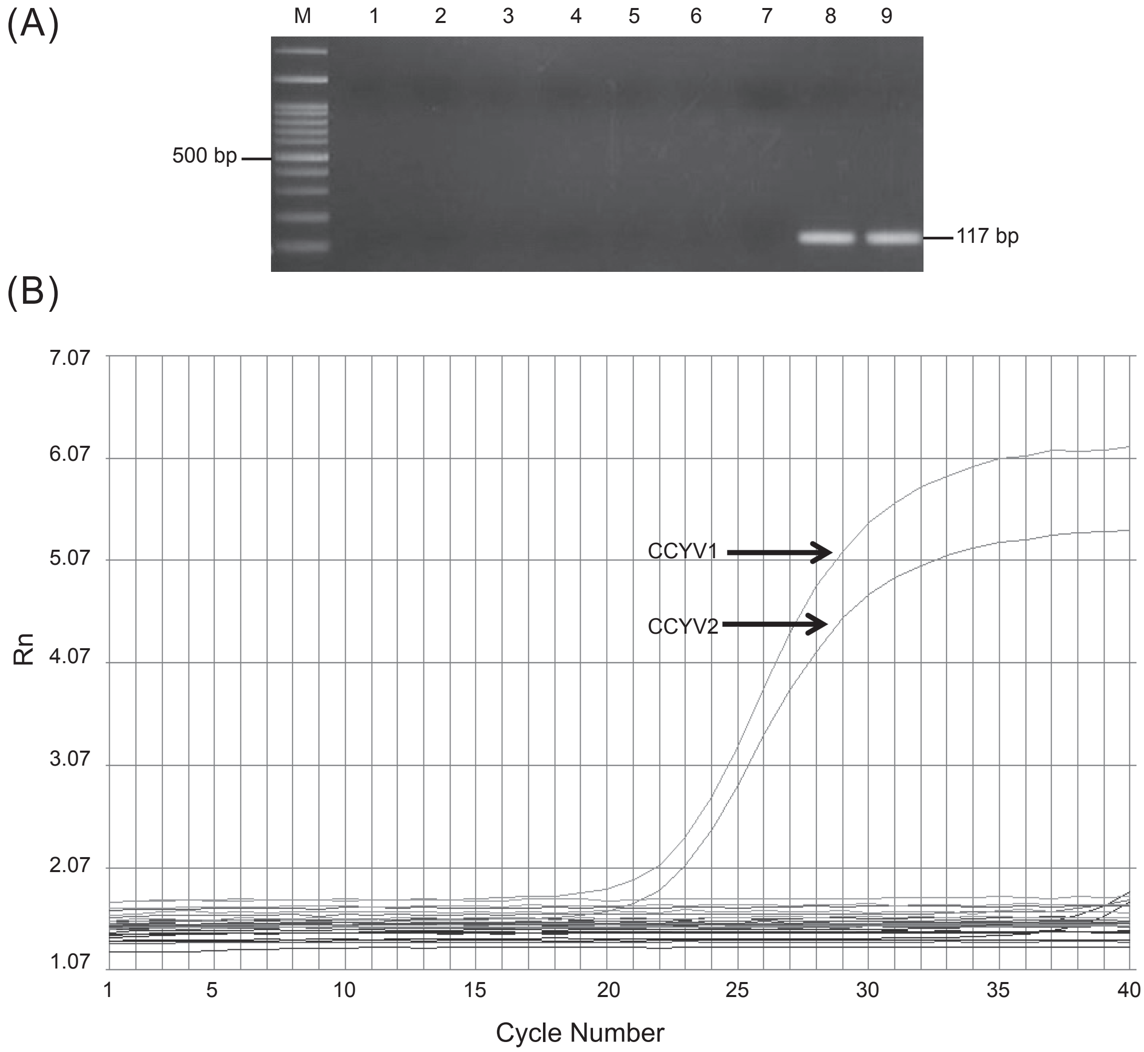

圖 1. 利用 RT-PCR (A) 和 real-time RT-PCR (B) 方法檢測 CCYV 的專一性試驗。行 1：NTC (無核酸模板對照組)；行 2：健康洋香瓜；行 3：健康南瓜；行 4：CMV 感染洋香瓜；行 5：CGMMV 感染洋香瓜；行 6：PRSV-w 感染洋香瓜；行 7：ZYMV 感染洋香瓜；行 8：CCYV-1 感染洋香瓜；行 9：CCYV-2 感染南瓜；行 M：100 bp ladder。

Fig. 1. Specificity of RT-PCR (A) and real-time RT-PCR (B) for detection of CCYV. Lane 1: NTC (No Template Control); Lane 2: healthy melon; Lane 3: healthy squash; Lane 4: CMV-infected melon; Lane 5: CGMMV-infected melon; Lane 6: PRSV-w infected melon; Lane 7: ZYMV-infected melon; Lane 8: CCYV-1-infected melon; Lane 9: CCYV-2-infected squash; and Lane M: 100 bp ladder.

Real-time RT-PCR 於 CCYV 檢測靈敏度試驗

為測試 real-time RT-PCR 檢測 CCYV 的靈敏度，以 real-time RT-PCR 方法定量 CCYV 的病毒量，將利用轉殖 CCYV 質體經由胞外轉錄技術製備 CCYV CP RNA 片段以 10 倍序列稀釋，由相當於 9.8×10^{10} CCYV copy 數稀釋至 9.8×10^{-1} CCYV copy 數和 NTC 共 10 組，以 RT-PCR 方法檢測靈敏度。結果顯示，靈敏度可至 9.8×10^{3} copy 數 (圖 2A)。相同樣品以 real-time RT-PCR 方法檢測，靈敏度可至 9.8 ×

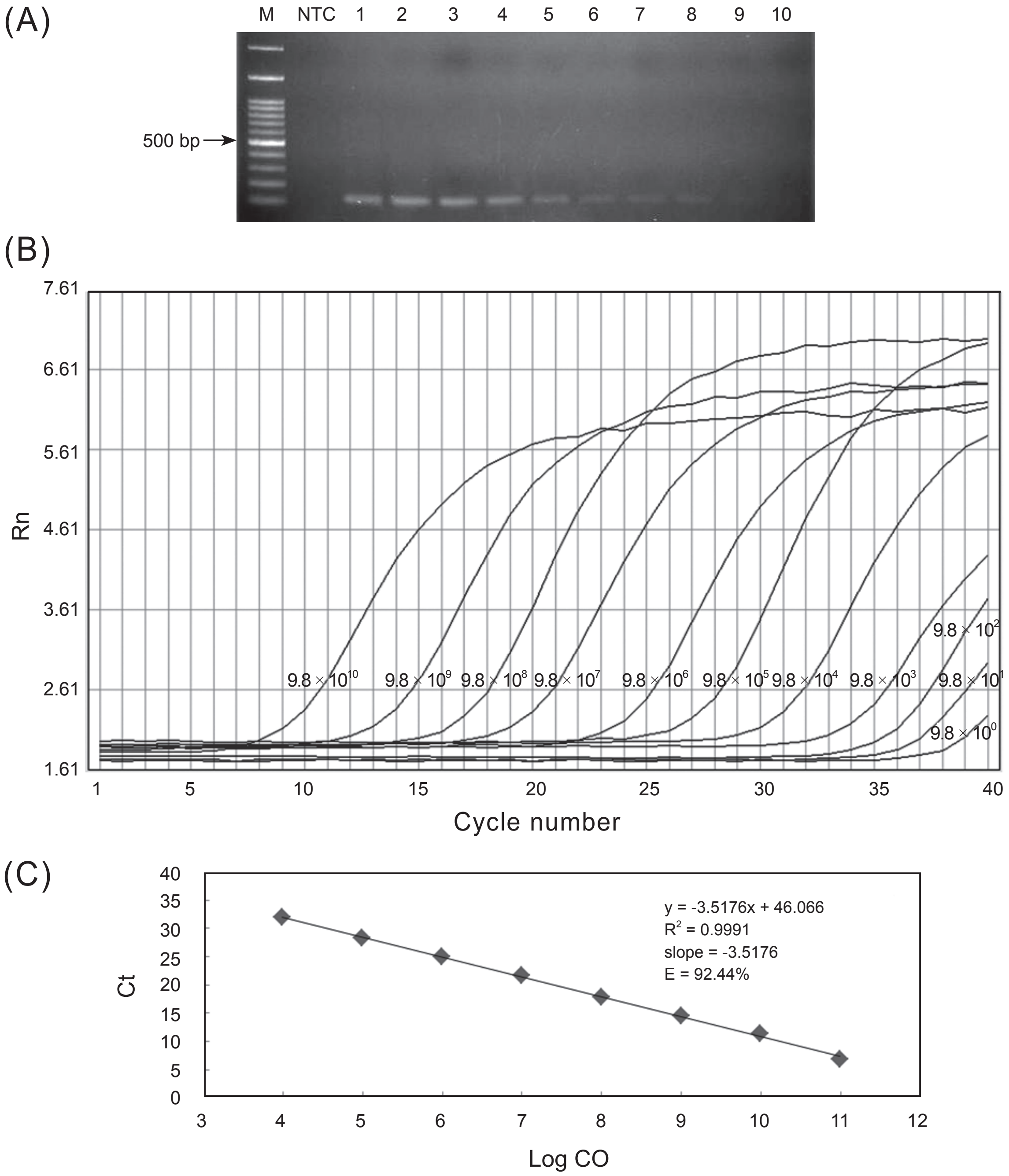

圖 2.　利用 RT-PCR (A) 和 real-time RT-PCR (B) 方法檢測 CCYV 經由胞外轉錄技術製備 CCYV CP RNA 片段的靈敏度試驗。(A) RT-PCR 跑膠的試驗結果，行 NTC：無核酸模板對照組；行 1–10：9.8×10^{10} 至 9.8×10^{1} copy no.；行 M：100 bp ladder。標準曲線 (B)–(C)，縱軸：Ct 值，水平軸：CCYV transcript RNA (9.8×10^{10} to 9.8×10^{1} copy no.) 序列稀釋 log copy number 值。

Fig. 2.　Sensitivity comparisons of real-time RT-PCR and conventional RT-PCR assays for detection of CCYV. (A) Amplification of 10-fold serial dilutions of the CCYV transcript RNA (9.8×10^{10} to 9.8×10^{-1} copy no) by the RT-PCR and analyzed by gel electrophoresis. Lane NTC: No Template Control; Lane 1–10: Cloned plasmid of CCYV (9.8×10^{10} to 9.8×10^{1}); M: 100 bp DNA ladder. (B)–(C), Amplification plots obtained with different concentration of RNA transcripts and the standard cure of 10-fold serial dilutions of CCYV RNA.

10^0 Copy 數。經由上述結果，在檢測 CCYV 靈敏度上，real-time RT-PCR 可檢測最低病毒濃度到 9.8×10^0 copy 數，使用 RT-PCR 則可檢測之最低病毒濃度為 9.8×10^3 copy 數，顯示 real-time RT-PCR 方法高於 RT-PCR 約 1,000 倍。將上述 real-time RT-PCR 靈敏度實驗結果繪製成標準曲線圖 (如圖 2B)，縱座標：Ct 值；橫坐標：CCYV-Transcript RNA copy 數的對數值 (log CO)，標準曲線方程式為 $y = -3.5176x + 46.066$，$R^2 = 0.9991$，E = 92.44%，上述試驗結果可應用於定量病毒含量。

田間洋香瓜 CCYV 偵測

本試驗於台灣台中市霧峰區田共採集 18 個洋香瓜葉片及 11 個南瓜葉片，分別以 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方式檢測。結果顯示，在 RT-PCR 的部分檢測出 CCYV 之洋香瓜田間樣品包括 3、4、7、10、14 和 16 號 (表 2)，檢出率 33% (6/18)，以及南瓜田間樣品 2、6 和 7 號 (表 3)，檢出率 27% (3/11) 檢測出 CCYV。而在 real-time RT-PCR 的部分，檢測出 CCYV 之洋香瓜田間樣品 3、4、7、8、10、11、12、14、15、16 和 17 號 (表 2)，檢出率 61% (11/18) 以及南瓜田間樣品 2、6、7 和 8 號 (表 3)，檢出率 36% (4/11)。其中，部分田間樣品如 M08、M12、M15、M17 及 S08 等以 RT-PCR 測不出 CCYV，但使用 real-time RT-PCR 則可檢測出 CCYV，顯示 real-time RT-PCR 對於 CCYV 的檢出率高於 RT-PCR。

表 2. 比較 real-time RT-PCR 和 RT-PCR 檢測田間洋香瓜的 CCYV 感染結果。

Table 2. Detection of CCYV infection of melon in the fields by TaqMan real-time RT-PCR and RT-PCR.

Field sample[z]	RT-PCR	TaqMan real-time RT-PCR
M01	–[y]	–
M02	–	–
M03	+	+ (223408)[x]
M04	+	+ (612209)
M05	–	–
M06	–	–
M07	+	+ (5818352)
M08	–	+ (4147)
M09	–	–
M10	+	+ (27095676)
M11	–	+ (1573)
M12	–	+ (2031)
M13	–	–
M14	+	+ (7033961)
M15	–	+ (2657)
M16	+	+ (36441)
M17	–	+ (8310)
M18	–	–
CCYV	+	+ (18655203)
HE	–	–
NTC	–	–

[z] HE: healthy melon; NTC: no template control; CCYV: CCYV infected melon.
[y] "+" indicates the presence of a clearly visible band on the agarose gel, whereas "–" indicates a negative reaction.
[x] The number of CCYV copies was calculated from the equation of standard curve by linear regression analysis plotting the threshold cycle values vs. the logarithm of the actual starting RNA copy number.

討論

CCYV 為近年來為害瓜類作物的新病毒之一，由於藉由蟲媒傳播的速度甚快 (Huang *et al*. 2010)，已成為台灣瓜類作物栽培區常發生的重要病害之一。目前使用 real-time PCR 方法偵測病毒已被廣泛使用於瓜類病害檢測，如 *Cucurbit yellow stunting disorder virus*、*Cucumber vein yellowing virus* (Gil-Salas *et al*. 2011)、*Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) 及 *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) (Gil-Salas *et al*. 2007) 等。本試驗在專一性測試，進行一般 RT-PCR 時，只對 CCYV (CCYV-1 和 CCYV-2) 產生 117 bp CCYV 產物之正反應，確定此所設計的引子具有專一性。使用 real-time RT-PCR 亦僅對感染 CCYV 之洋香瓜植株有反應，而對健康的洋香瓜、健康的南瓜、CMV 感染洋香瓜植株、CGMMV 感染洋香瓜植株、PRSV-W 感染洋香瓜植株、ZYMV 感染洋香瓜植株則均為負反應。經由上述 2 個試驗結果顯示，所設計的引子以 RT-PCR 及 real-time RT-PCR 方法試驗皆對 CCYV 病毒基因片段具有專一性。

表 3. 比較 real-time RT-PCR 和 RT-PCR 檢測田間南瓜的 CCYV 感染結果。

Table 3. Detection of CCYV infection of squash in the fields by real-time RT-PCR and RT-PCR.

Field sample[z]	RT-PCR[y]	TaqMan real-time RT-PCR
S01	–	–
S02	+	+ (2072)[x]
S03	–	–
S04	–	–
S05	–	–
S06	+	+ (88756)
S07	+	+ (77357)
S08	–	+ (1558)
S09	–	–
S10	–	–
S11	–	–
CCYV	+	+ (2550351)
HE	–	–
NTC	–	–

[z] HE: healthy melon; NTC: no template control; CCYV: CCYV infected squash.

[y] RT-PCR results: +, indicates a clearly visible band in gel electrophoresis; –, indicates a negative reaction.

[x] The number of CCYV copies was calculated from the equation of standard curve by linear regression analysis plotting the threshold cycle values vs. the logarithm of the actual starting RNA copy number.

Huang *et al*. (2010) 以 CCYV 的 Hsp70h 基因設計引子對，並藉由 RT-PCR 方式首次在台灣檢測出 CCYV 病毒。也有學者以免疫偵測方式檢測 CCYV，並探討其檢測靈敏度和專一性 (Kubota *et al*. 2011)，其中在偵測 CCYV *CP* 蛋白的西方墨點法中具有專一性，而在 DAS-ELISA 中，檢測 CCYV CP 蛋白的靈敏度可至 2 ng mL^{-1}；Lin *et al*. (2012) 以 CP 基因為設計區段，設計出具有可偵測至 10^{-4} 稀釋濃度的 RT-PCR 引子對。由前人的研究結果顯示，利用血清學所發展之 ELISA 法的靈敏度仍較 RT-PCR 法來的低，因此有發展 RT-PCR 之需求。在定量病毒試驗，Abrahamian *et al*. (2013) 發展以 hsp70h 基因序列同時檢測 CCYV 及 CYSDV 的方法，顯示檢測的靈敏度可達到 100 fg。本研究利用 CCYV transcript RNA 進行 real-time PCR 靈敏度試驗，結果顯示檢測靈敏度可至 10^{-8} ng (9.8×10^0 copy number)，並建立 CCYV 病毒標準曲線，由試驗顯示靈敏度較 Abrahamian 高。此外，本研究另以抽取感染 CCYV 洋香瓜的全 RNA 試驗，以 10 倍序列稀釋方式，由 10 ng μL^{-1} 稀釋至 10^{-5} ng μL^{-1} 進行試驗，以 RT-PCR 方法檢測靈敏度，結果顯示靈敏度可至 10^{-2} ng。相同樣品以 real-time RT-PCR 方法檢測，顯示靈敏度可至 10^{-4} ng (結果未列出)。經由上述結果，在 CCYV 檢測靈敏度上，real-time RT-PCR 方法比 RT-PCR 靈敏 100 倍以上。以 RT-PCR 和 real-time RT-PCR 方式檢測 CCYV，在 RT-PCR 的部分，洋香瓜田間樣品檢出率 33%、南瓜田間樣品檢出率 27%。而在 real-time RT-PCR 的部分，洋香瓜田間樣品檢出率 61%，以及南瓜田間樣品檢出率 36%。經由上述的試驗觀察到設計的引子和探針，不論是 RT-PCR 或是 real-time RT-PCR 可以應用於田間樣品檢測。此外，部分 RT-PCR 測不出 CCYV 的田間樣品，經由 real-time RT-PCR 反應可檢測的到 CCYV，顯示 real-time RT-PCR 對於 CCYV 的檢出率高於 RT-PCR。由結果推測，real-time PCR 法在低濃度之 CCYV 感染植株中，仍可檢測出此病毒之優點。利用 real-time PCR 法，將有助於做為早期田間病害診斷之依據。

引用文獻

Abrahamian, P. E., R. Seblani, H. Sobh, and Y. Abou-Jawdah. 2013. Detection and quantitation of two cucrbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. J. Virol. Methods 193:320–326.

Dietzgen, R. G. and J. E. Thomas. 1991. Properties of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Hawaii, Indonesia and Tonga. Aust. Plant Pathol. 20:161–165.

Gil-Salas, F. M., J. Morris, A. Colyer, G. Budge, N. Boonham, I. M. Cuadrado, and D. Janssen. 2007. Development of real-time RT-PCR assays for the detection of *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) and *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) in the whitefly vector *Bemisia tabaci*. J. Virol. Methods 146:45–51.

Gil-Salas, F. M., J. Peters, N. Boonham, I. M. Cuadrado, and D. Janssen. 2011. Yellowing disease in zucchini squash produced by mixed infections of *Cucurbit*

yellow stunting disorder virus and *Cucumber vein yellowing virus*. Phytopathology 101:1365–1372.

Gu, Q. S., Y. H. Liu, Y. H. Wang, W. G. Huangfu, H. F. Gu, L. Xu, F. M. Song, and J. K. Brown. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in China. Plant Dis. 95:73.

Gyoutoku, Y., S. Okazaki, A. Furuta, T. Etoh, M. Mizobe, K. Kuno, S. Hayashida, and M. Okuda. 2009. Chlorotic yellows disease of melon caused by *Cucurbit chlorotic yellows virus* a new crinivirus. Jpn. Phytopathol. 75:109–111.

Hamed, K., W. Menzel, G. Dafalla, A. M. A. Gadelseed, and S. Winter. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting muskmelon and cucumber in Sudan. Plant Dis. 95:1321.

Huang, L. H., H. H. Tseng, J. T. Li, and T. C. Chen. 2010. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* infecting cucurbits in Taiwan. Plant Dis. 94:1168.

Kubota, K., T. Usugi, and S. Tsuda. 2011. Production of antiserum and immunodetection of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a novel whitefly-transmitted crinivirus. J. Gen. Plant Pathol. 77:116–120.

Lin, Y. T., J. Y. Liao, C. H. Tsai, and T. C. Deng. 2012. Complete nucleotide sequence of RNA2 of *Cucurbit chlorotic yellows virus* isolated from melons in Taiwan and its comparisons with currently existing isolates. J. Taiwan Agric. Res. 61:132–143. (in Chinese with English abstract)

Okuda, M., S. Okazaki, S. Yamasaki, S. Okuda, and M. Sugiyama. 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus Crinivirus. Phytopathology 100:560–566.

Ueda, H., Y. Yamaguchi, and H. Sano. 2006. Direct interaction between the *Tobacco mosaic virus* helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. Plant Mol. Biol. 61:31–45.

Wisler, G. C., J. E. Duffus, H. Y. Liu, and R. H. Li. 1998a. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted Closteroviruses. Plant Dis. 82:270–280.

Wisler, G. C., R. H. Li, H. Y. Liu, D. S. Lowry, and J. E. Duffus. 1998b. *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. Phytopathology 88:402–409.

Zeng, R., F. M. Dai, W. J. Chen, and J. P. Lu. 2011. First report of *Cucurbit chlorotic yellowsvirus* infecting melon in China. Plant Dis. 95:354.

Evaluation of a TaqMan One-Step Real-Time RT-PCR Method for the Detection of CCYV

Cheng-Ping Kuan[1,*], Yu-Chang Lin[2], Ching-Shan Tseng[1], Ying-Huey Cheng[3], and Ting-Ching Deng[4]

Abstract

Kuan, C. P., Y. C. Lin, C. S. Tseng, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2015. Evaluation of a TaqMan one-step real-time RT-PCR method for the detection of CCYV. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):204–212.

In this study, a diagnostic assay for *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) using TaqMan-based real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was developed. Specific primers were designed by targeting the coat protein gene of CCYV. The sensitivity of qRT-PCR for the detection of CCYV when compared to that of RT-PCR assay was approximately 100–1,000 times higher. The assay is highly specific for CCYV only, no cross-reaction was observed on cucurbits infected with other cucurbit viruses using this assay. The technique is sensitive and accurate, and allows rapid detection and quantitation of CCYV in both field and experimental material used for the surveillance and diagnosis of CCYV.

Key words: *Cucurbit chlorotic yellows virus*, Detection, Real-time RT-PCR.

Received: November 18, 2014; Accepted: February 11, 2015.

[*] Corresponding author, e-mail: pcr123@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[4] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):213–227 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.06 研究報告

應用重要-表現程度分析於農業試驗所解說媒體之成效評估

蕭淑芬[1] 謝雨蒔[2] 陳烈夫[2,*]

摘要

蕭淑芬、謝雨蒔、陳烈夫。2015。應用重要-表現程度分析於農業試驗所解說媒體之成效評估。台灣農業研究 64(3):213–227。

行政院農業委員會農業試驗所除就國內農業科技研究外，同時亦展示研發成果對外提供解說服務，以彰顯其工作主軸及成效。為了更深入瞭解參訪者對於農試所各項展示內容及解說服務的看法，乃於 2013 年進行滿意度問卷調查，問卷採 5 點量表設計。本研究有效問卷 193 份，有效問卷率達 93.2%。經研究調查結果顯示，參訪者參觀農試所以觀摩學習動機為主，其次是受到農試所環境特質所驅使及工作上需求。參訪者實際體驗後，對於農試所提供之解說服務皆持以正面與肯定的回應，普遍覺得滿意，在 20 項服務評估變項中認為表現極顯著高於預期者，為「解說牌設計」的「解說文字大小適中」、「影視播放」的「播放的內容有趣並具有創意」、「解說人員」的「解說具有啟發性」。本研究透過重要-表現程度分析，並發現「影視播放」的「播放的內容長度適中」、「解說人員」的「解說時間掌控的很好」與「說話音量及速度適中」之滿意度不如預期，是應該加強改善的重點項目，值得重視與改進。整體服務滿意度成效方面，參訪者一致對「導覽人員安排」的滿意度最高 (平均滿意度高達 4.63)，參訪後咸認有利於個人或工作的平均滿意程度為 4.18，也表達願意再度來訪與向別人推薦的程度平均值分別為 4.51 與 4.45，顯示農試所展示經營有相當的成果。藉由本研究之資料分析，不但能充分瞭解參訪者對農試所解說服務品質的期望與滿意度，更能釐清本所服務缺口，有利於研擬改善之因應策略。

關鍵詞：重要-表現程度分析、解說媒體、滿意度調查、動機分析、服務缺口。

前言

我國政府於 2008 年推動「政府服務創新精進方案」，針對建構高服務效能及具競爭力的行政體系，倡議必須先致力於提供品質與效率兼備的公共服務，以達成優質便民的服務品質。同時，更藉此建立多元化民意回饋管道，加強宣導為民服務創新措施，以提高民眾之滿意度及宣導周知率。行政院農業委員會為配合推行農業施政成果與宣導農業政策，使社會各界能充分的瞭解與利用，並進而提倡民眾教育，故責其所屬機關均需提供開放參訪服務活動，並展示各機關之研發成果。據 2004–2013 年農委會施政績效報告統計，每年平均各機關處理國內、外團體參觀訪問，分別農業機關 2,303 人次，林業機關 17,025 人次、漁業機關 29,357 人次及牧業機關 2,603 人次。而對於所提供的各種展示服務內容，亦需作進一步的評鑑工作，這不僅可以自我檢視內部行政運作與外部服務提供的良窳，同時也可藉此進行服務推廣，並建立專業形象。解說媒體 (interpretive media) 是參訪者在參觀的過程中最常接觸到的設施之一，透過解說引導，可提升受訪單位與參訪者之間的互動關係，甚有助於受訪單位的業務推廣。然而，解說之媒介角色既占有如此重要地位，其是否能發揮功能與成效，是值得探討的議題。

投稿日期：2014 年 10 月 21 日；接受日期：2015 年 2 月 26 日。
* 通訊作者：leevchan@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所技術服務組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所技術服務組副研究員。台灣 台中市。

解說學之父 Tilden (1977) 認為解說並非只是單純的傳遞真實訊息，而是一種透過原始物件的使用，以親身體驗與輔助說明來揭示事物內在意義與相互聯繫的活動，藉此幫助參訪者對受訪單位形成關注或鑒賞，增加參訪者涉入程度與理解機關目標的服務，是一種重要且有效的管理工具。除此，藉由解說可提供相關資訊來滿足人們的需求與好奇，激勵其對所描述事物產生新的見解與熱誠 (Wu 1997)。而解說也是一種具塑造情境效果的藝術，透過人們對事物之清晰瞭解，可培養敏銳觀察力、緩和對立觀點、傳達愉悅訊息及可強化體驗；解說更是一門科技整合的科學，其研究深具挑戰性 (Wu & Chen 2005)。近年來，隨著科技時代進步，增加了許多新的高科技解說工具，使解說媒體服務更生動多樣化。美國著名解說學家 Sharpe (1982) 將解說媒體服務之類別區分為人員 (參與式) 解說與非人員 (非參與式) 解說：(1) 人員解說服務係由解說員直接向參訪者解說各種相關資源或資訊內容，一般分為資訊服務、活動引導解說、據點解說及現場表演等 4 種方式，常設的解說人員可讓參訪者感覺受到歡迎，具有雙向溝通的優點，且因具有親和力與適應性，故被認為是最好的解說媒體；(2) 非人員解說是在參訪者參觀過程中，不一定有機會接觸到人員解說服務，大部分的解說服務可能被其他解說設施所代替，但這些設備並非人員解說的替代品，而是人員解說的擴展與延伸，其實施方式可分為視聽器材、解說標誌牌、解說出版品、自導式活動、展示設施、遊客中心、視聽多媒體等。不同解說媒體因本身特性不同而有各自的適用時機與優缺點，而同一種解說媒體也可能因適用時機不同而有不同解說方式，因此許多管理單位常會綜合運用各種不同特性的解說服務，來達到解說與參訪體驗的成效。很多研究顯示，瞭解新事物是許多參訪者相當重要且普遍的參觀動機，而解說服務正好可滿足他們的需求，是一種相當有效的資源管理工具 (Hooper & Weiss 1987)。

使用者滿意理論包含期望-績效理論 (expectation-performance theory) 與認知失調理論 (cognitive dissonance theory)，前者認為使用者對產品的使用結果如符合或超過預期就感覺滿意甚至極滿意，後者則強調每一使用者在使用後皆會存在某些焦慮行為，應當探討使用者不滿意度及如何處理方式，因此使用者一開始以期望為基礎形成態度，其後則以消費的滿意度來調整其態度，當二者存在相當一致性時，使用者將感覺滿意 (Binter 1990; Engel *et al*. 1995; Pitt *et al*. 1995)。Bolton & Drew (1991) 認為使用者對服務的實際認知會直接影響其對服務的評價，而服務品質即為期望獲得服務與認知獲得服務二者之間差距的函數。而 Kotler (1999) 亦主張使用者滿意度是使用者認知的產品績效 (功能特性) 與個人期望間差異之函數，此二者比較後所形成之感覺愉悅或失望的程度。服務品質既被描述為態度之形成，與使用者滿意度相關卻不相等，二者皆為期望與績效的比較結果。然而，服務品質是長期整體評估，而滿意度是特定交易之衡量 (Bolton & Drew 1991; Kang & Song 2014)。Teas (1993) 認為滿意度是使用者對特定行為之知覺，服務品質是滿意度之累積。Oliver & DeSarbo (1988) 認為服務品質是使用者滿意之先行變數。Parasurman *et al*. (1985, 1988) 認為較高的服務品質認知，將導致使用者滿意度提升。Cronin & Taylor (1992) 運用 SERVQUAL 量表針對電話公司之服務品質進行實證研究發現，服務品質是使用者滿意之重要前提，使用者滿意度則是預測消費者購買行為與再購意願之最有力的解釋因素。惟亦有實證認為顧客滿意是服務品質之前置反應 (Binter 1990; Bolton & Drew 1991; Pu 2014)。Parasuraman *et al*. (1994) 彙整學者們之看法提出整合觀點，認為對某項特定交易而言，服務品質是交易滿意之前因，惟對整體評量而言，累積多項交易的使用者滿意，將形成對廠商之整體意象；期望服務會影響認知服務，此顯示使用者對於一項服務之事前期望，將影響其對該項服務之水準認知，進而影響其對該項服務之整體服務品質評價。服務品質與使用者滿意是相似概念，一般並未加以嚴格區分，惟服務品質與使用者滿意間之關係，常因學者研究角度不同而存在不同觀點，通常使用者滿意的範圍

較服務品質廣泛，且服務品質會影響使用者滿意度 (Zeithaml & Bitner 2000)。由於使用者滿意度上升，忠誠度也會上升，故一般學者咸認為先服務品質而後使用者滿意度，此論點與 Cronin & Taylor (1992, 1994) 之實證結論相同 (Susan 2002)。本研究前提之理論，假設同樣是認為服務品質會影響使用者滿意度。

近年來，國內外對解說領域相關研究已有蓬勃發展，許多學者利用重要-表現程度分析 (importance-performance analysis; IPA) 來探討解說服務的品質與滿意度，所獲分析結果能瞭解參訪者需求與受訪單位實際服務品質等之評價資訊，據此讓管理者可充分掌握自己組織營運現況，以及確知服務內涵之優缺點，以作為日後經營管理改善之基礎。IPA 最初由 Martilla & James (1977) 提出，用來分析汽車銷售商之服務品質；O'Sullivan (1991) 進而將 IPA 分析步驟作有系統的整理。IPA 運用二維座標圖繪製出「重要程度」(受試者所認為的重要性) 與「表現程度」(受試者對於服務表現的滿意度) 間的關係，是一種透過特定服務或產品之評估項目在座標圖之相關位置進行優先排序比較的技術 (Sampson & Showalter 1999; Wu & Shieh 2009)。IPA 自 1970 年代起迄今被廣泛應用在辨識商標、產品、服務、觀光及零售業等行業的優勢與劣勢 (Bailey & Pearson 1983; Cheron *et al*. 1989; Chapman 1993; Kozak & Nield 1998; Chu & Choi 2000; Wang 2001; Chiang 2007; Sörenssona & von Friedrichs 2013; Feng *et al*. 2014)。Sethna (1982) 明確指出 IPA 是辨別服務品質的一個有效方法。Hemmasi *et al*. (1994) 指出 IPA 不僅可評估使用者對產品 (如活動或服務等) 的屬性偏好，也能夠評估供給者在屬性上的表現程度，此有別於一般傳統使用的 SERVQUAL 法，故認為 IPA 可做為衡量服務品質的另一種替代方法。Aktas *et al*. (2007) 亦指出 IPA 是企業管理者用來衡量目前公司市場競爭位置、確認公司經營改善機會及引導公司策略方向的分析技術，同時亦可作為解釋參訪者知覺，以提供管理者瞭解參訪者的偏好與需求，用來提升參訪者滿意度與再次來訪的意願。由於 IPA 使用方便，且可快速提供經營者有用的資訊，已被公認為量測活動及服務的理想工具 (Aktas *et al*. 2007; Alexandra 2012; Azzopardia & Nash 2012; Liao 2013)。近年來，已有許多研究利用 IPA 來探討參訪者對受訪單位所提供之解說服務的品質與滿意度，結果顯示不同背景變項之參訪者對各項解說媒體服務的重視度與滿意度皆有顯著差異 (Hollenhorst *et al*. 1992; Joshi 1992; Baker & Crompton 2000; Wu & Chen 2005; Holzer *et al*. 2009; Liu *et al*. 2010)。國內學者 Chiang (2002) 亦應用 IPA 探討國立科學工藝博物館解說媒體之成效，結果發現觀眾不同的背景與參觀動機間皆呈現顯著差異，觀眾的參觀動機 (自我充實動機、機構特質動機) 與解說媒體預期想法之間存在顯著正相關，而也透過多元迴歸分析 (multiple regression analysis) 發現自我充實動機與解說媒體偏好對各項解說媒體的滿意度亦皆呈顯著正相關。Wu & Chiang (2004) 再進行國立科學工藝博物館觀眾參觀動機與滿意度之研究，發現觀眾到該館的主要參觀動機為增廣見聞，且以抱持自我成長動機前來者對於各項解說媒體的滿意度最高。

行政院農業委員會農業試驗所涵蓋不同特色展館，其中以研發成果展示室、土壤陳列館、昆蟲標本館等參訪者最多，同時提供許多解說服務，如提供參訪者人員解說、解說展示品、解說牌、解說摺頁等各式各樣的解說服務。在眾多的導覽解說服務之下，各種解說服務能否幫助參訪者對展示成果有更深度的瞭解，藉以達成增廣知識、學習及傳播的效果，一直是農試所關心的課題。農試所成立至今，在外賓參訪方面，雖每年均持續進行問卷調查，但從未有正式且深入的調查研究。為了檢視各項解說服務成效，農試所曾於 2009 年「機關績效自我評估」報告中，以參訪者對所提供服務之反映態度與使用行為進行調查，但該項研究僅是以較精簡的問卷方式，且距今 (2014) 已時隔 5 年。這段期間內農業科技研究內容資源急遽變化，農業研究類型有著不同的發展與轉變，而對於服務內容亦應有相對的調整與增添。因此，有必要再次著手進行深入研究，希望藉此確實瞭解參訪者對於本所各項設施與研

發成果展示的滿意度，並運用客觀的資料分析來探明農試所提供之各項服務是否符合參訪者期待，將做為持續改善以提升服務品質之依據。本研究針對參訪者使用農試所各展示地點不同的解說服務，在以認為服務品質會影響使用者滿意度之前提下，以參訪者對於解說媒體的滿意程度做為解說媒體的成效界定，包括使用前認知的重要程度與使用後的表現程度做為評估解說服務品質的標準，透過瞭解參訪者的背景、參觀動機、對解說媒體之預期想法與實際體驗情形及各變項間的關係探討，並以 IPA 為服務品質測量工具，來闡明參訪者對農試所解說媒體的滿意度，進而找出影響滿意度的重要因素，以為後續改善之依據參考。

材料與方法

本研究以參訪者的背景、特性、參訪動機、參訪前預期想法及參訪後表現滿意度進行各項問項調查及其統計分析，並應用 IPA 將參訪者體驗本所內心之期許視為重要程度，體驗後之滿意度視為表現程度，繪製本所解說服務品質之 IPA 圖，以探討其重視程度與表現程度間之關係。最後進行整體滿意度成效分析，以提出經營管理改善方向之建議。

問卷設計

本研究以服務設施 (包括公共設施及解說設施) 作為衡量農試所服務品質的設施構面，並增加「解說人員」之衡量構面，以相關題項進行特性修改，增加本問卷題項內容的廣度，來測量參訪者對於本所服務設施與解說人員的服務品質期望與實際滿意差距。問卷設計採封閉式問卷型式，內容分為 5 部分，第 1 部分為參訪者個人基本資料，包括性別、年齡、教育程度、單位服務年資等問項；第 2 部分為參訪者之特性，如參訪次數等；第 3 部分為參訪者之動機，如觀摩學習動機、機構特質動機及工作需求動機；第 4 部分針對服務設施的訪前期望 (重要程度) 與實際體驗 (表現程度)；第 5 部分為解說媒體之整體滿意度成效調查問項。問卷給分採 5 點量表 (five-point scales)，受試者將依個人預期重要程度可勾選「非常重要」、「重要」、「普通」、「不重要」、「非常不重要」其中一欄位，訪後實際體驗表現認知則勾選「非常滿意」、「滿意」、「普通」、「不滿意」、「非常不滿意」，於整體滿意度成效可勾選「非常滿意」、「滿意」、「普通」、「不滿意」、「非常不滿意」或者「非常實用」、「實用」、「持平」、「一點點有用」、「沒有用」等等，而不同點欄位計分各為 5、4、3、2 及 1，得分愈高表示程度愈高。

資料蒐集方法

本研究以參訪農試所研發成果展示室、土壤陳列館、昆蟲標本館之參訪者為受測對象。在參訪者前往各區使用服務設施與所提供的服務後，進行問卷調查。抽樣的方法是每參訪團逢機選取 1–5 位 18 歲以上訪客填寫，如人數在 5 位以下者取 1 名、5–10 位者取 2 名、10–20 者取 3 名、20–30 位者取 4 名、30 位以上者取 5 名，並有專人專門從旁協助填寫；抽樣期間自 2013 年 1 月 1 日起至 12 月 31 日止。

信效度分析

本研究首先針對問卷資料進行信度分析 (reliability analysis) 來衡量問卷中各評估變項的穩定度與一致性，一般採用 Cronbach’s α 係數進行檢驗，根據學者 Nunnally (1978) 提出的信度檢驗標準，Cronbach’s α 值大於 0.7 較佳，而至少需大於 0.5。效度分析 (validity analysis) 方面，本研究亦會檢驗研究之問卷內容與建構，使其能足夠涵蓋主題的程度與能測量理論概念或特質的程度，此部分係依相關文獻作為設計問卷基礎，並將問卷初稿交予相關專業管理階層人士作詳細檢視與修正。

資料統計分析

依據本研究之目的與假設，將各問卷回收資料進行以下統計分析：(1) 描述性統計 (descriptive statistics)：各問項進行樣本分布之次數分析與百分比分析，可用於瞭解參訪者之基本資料與特性的分布狀況。(2) 成對 t 檢定 (paired t-test)：探討參訪者對展示單位各服務接觸點之前預期重要性與實際體驗後滿意認知之間是否存在顯著差異。(3) IPA 法：參照

O’Sullivan (1991) 所整理的 IPA 之分析步驟，將參訪者針對各問卷題項 (即評估變項) 分別在「重要程度」(預期想法) 與「表現程度」(實際體驗) 之評定等級，以重要程度為縱軸，表現程度為橫軸，將各評估變項在重要程度與表現程度的數值視為座標並標示在一個 2 維空間圖上，並以各變項之座標的總平均值為分隔點，將空間分成 4 個象限，如圖 1 所示。而 4 個象限之策略意涵分別為：1. 第 1 象限表示參訪者對落於此區的變項認為重要程度高且表現程度也高，應該「繼續保持」(keep up the good work)；2. 第 2 象限表示參訪者對於落在此區的變項重要程度高，但表現程度卻低，是「改善的重點」(concentrate here)；3. 第 3 象限呈現出重要程度與表現程度皆低，表示落在此象限的變項在改善進程之「優先順序低」(low priority)；4. 第 4 象限表示參訪者對落在此區的變項認為重要程度不高，但表現程度卻高，亦即落在此象限的變項已能滿足或超出參訪者需求，不必太過強調，屬「供給過度」(possible overkill)。本研究將透過各變項分落在 4 個象限之結果解讀，來評估服務品質之滿意度，並作為經營管理改善之參考。(4) 非成對 t 檢定 (unpaired t-test) 與變方分析 (analysis of variance; ANOVA)：為探討參訪者之不同的性別、年齡、教育程度、工作年資及參訪次數等基本資料與特性是否會對參訪服務整體滿意度成效造成影響，進行統計顯著差異性分析，如針對只有兩種級別之基本資料或特性 (如性別) 採用非成對 t 檢定，3 級 (含) 以上級別 (如年齡、教育程度等) 則使用 ANOVA。

本研究上述各項統計分析，均採用 SPSS 統計軟體 (SPSS Inc. 2007) 進行運算。

結果

本研究調查之回收問卷為 207 份，扣除回答不完整之無效問卷 14 份，共計有效問卷 193 份，有效樣本回收率為 93.2%。在信度分析方面，經輸入前 30 份問卷資料所得 Cronbach’s α 係數，發現每一構面的 Cronbach’s α 係數皆都大於 0.70，是為「可信」；另本研究調查問卷依相關文獻作為設計問卷基礎，亦將問卷初稿交予相關專業管理階層人士檢視並作修正，故調查問卷效度可視為無慮狀態。

歷年參訪數量之統計

農試所為國內農業科技研究的重鎮，研發成果甚為豐碩，為世界各國爭相研習觀摩及參觀訪問之對象，2006–2013 共 8 年來統計參訪總人數高達 4,940 人，平均每年來所參訪 617.5 人，總參訪件數 450 件，年平均參訪 56.3 件 (此僅計算位於台中市霧峰區的總所部分，尚未納入嘉義分所與鳳山分所之參訪來賓)。由參訪資料之分析顯示 (圖 2)，參訪農試所的人數及件數皆逐年遞增，尤其 2011 年因有單一參觀團體 600 人以致該年參訪總人數暴增超過千人。由最近兩年參訪之件數及人數來看，每年皆約 600 多人到訪，而參訪件數有大幅成長，到 2013 年參訪件數已高達 92 件。顯示參觀訪問團已有趨於小團體的傾向，顯示出農試所導引服務人員之作業，因接待小團體團數增多，相對地導致工作量更加繁重。

參訪者基本資料與特性之分布分析

依據問卷調查結果顯示 (表 1)，農試所外賓參訪者性別，男性與女性各占 59.1% 與 40.9%，其比例大概為 3：2 左右。參訪者

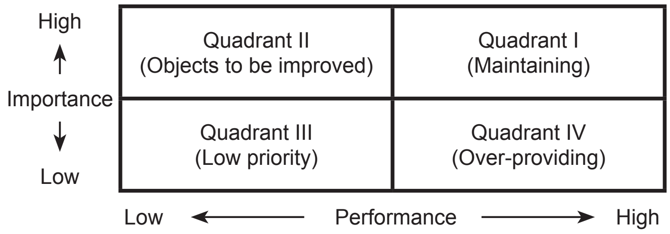

圖 1. 重要-表現程度分析模式圖。

Fig. 1. The original framework of importance-performance analysis.

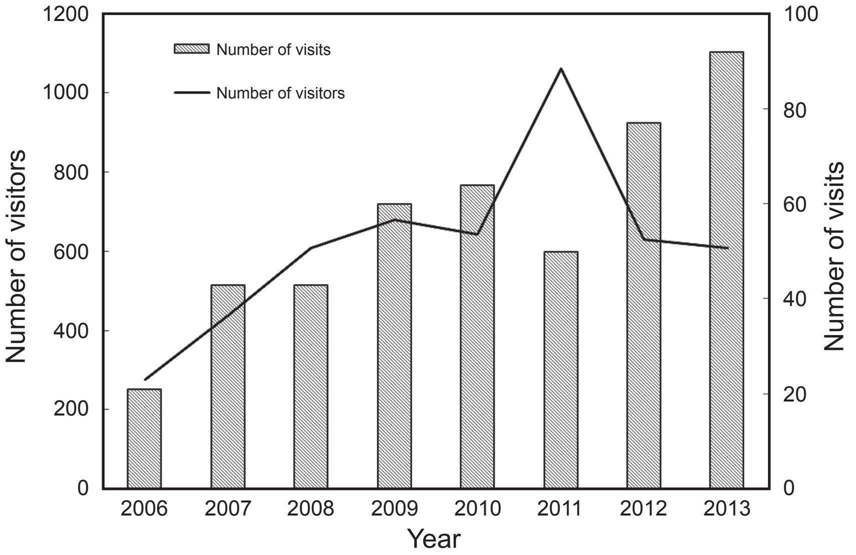

圖 2. 2006–2013 年農業試驗所來賓參訪件數及參訪人數。

Fig. 2. The number of visits and visitors of TARI in 2006–2013.

年齡百分比由高到低，分別以 31–40 歲最高為 32.7%， 其 次 18–30 歲 29.0%，41–50 歲 19.6%，51–55 歲 11.4%，55 歲以上 7.3%。參訪者教育程度，依次為研究所以上 49.5%，大學 35.5%，專科 10.3%，高中 (職) 3.7%，國 (初) 中 0.9%，在近次調查中因礙於新規定，國小以下不接受參訪，因此百分比為 0。參訪者之農業相關職業，以農業從業人員 41.7% 為最多，其次為現職與退休研究人員 32.1%，農學院相關科系員工及學生計有 26.2%。而非農業相關職業之參訪者，普遍是家管、工業及學生，皆各占 20.0%，其次為服務業 12.0%，資訊業、軍公教及金融業各 8.0%，以及退休人士 4.0%。總計職業類別，仍以與農業相關者最多，高達 87.0%。參訪者單位服務年資分布，以 11 年以上 38.3% 最多，其次 2–5 年 24.3%，6–10 年及 1 年以下年資者較少分占 19.6% 及 17.8%。參訪者之參訪次數以第 1 次參訪 63.6% 為最多，其次為 2–5 次占 29.0%，參訪次數甚至高達 11 次以上者也有 6.5%。參觀時間以星期四及星期二居多各占 26.3%，而星期五最少 9.7%。因農試所為公務單位，實有別於其他公營事業於假日開放及星期一公休之運作模式，星期六、日及國定假日均不接受參訪。而參訪者實際停留時間以半天行程為主 (4 h 內共占 76.4%)。參訪者來所之交通工具以遊覽車為主 (占 68.9%)，自行開車及高鐵配搭公務車為次。結伴參訪以學校團體及公司團體占最多，各占 40.9% 與 37.8%。參訪之訊息管道有 51.4% 受訪者主要是由工作上得知，其他來源 24.3%，經由農業單位介紹則占 18.7%。

參訪者之動機分析

本研究為對參訪者動機之諸多變項達到執簡馭繁之目的，乃針對 14 項參訪動機進行分析，結果如表 2 所示。14 項動機中仍以抱持觀摩學習心態為主，其中以「增廣見聞滿足好奇心」、「想觀看特殊的展示」、「發揮創造力」及「認識與尋求農業文化」之認同得分排序高居所有動機項的前 4 位，甚少是因為想「獲得成就感」、「紓解壓力」、「尋找靈感感受寧靜」(得分排序分居第 9、10、12)；其次是因為受到機關特質吸引而來，希望透過參訪農試所，能夠「感受特有的氣氛」(得分排序第 5)，以及「因展示知名度高而來」(得分排序第 6)，但很少僅僅是為了「回憶過去的體驗」、單純透過「親朋好友的推薦」或只不過「路過順便進來看看」(得分排序落於最後 3 位)；有些則

表 1. 農業試驗所參訪者基本資料及特性分析。

Table 1. The distribution analysis of the basic data and characteristics of guests visiting TARI.

Basic information	Item	Percentage (%)[z]	Basic information	Item	Percentage (%)
Gender	Male	59.1	Visit time	Mon.	18.1
	Female	40.9		Tues.	26.3
Age	18–30	29.0		Wed.	19.6
	31–40	32.6		Thurs.	26.3
	41–50	19.6		Fri.	9.7
	51–55	11.4		Sat. & Sun.	0.0
	55 or above	7.3		Holiday & observances	0.0
Education	Junior school	0.0	Detention time	1 h	12.9
	Junior high school	0.9		2 h	28.5
	High school/vocational school	3.7		3 h	22.6
	College	10.3		4 h	12.4
	University	35.5		5 h	7.8
	Graduate school or above	49.5		6 h	4.1
Agriculture-related occupation	Serving and retired personnel	32.1		7 h	7.8
	Agriculture employee	41.7		8 h or above	4.1
	Agriculture-related departments	19.6	Transportation	Travel bus	68.9
	Student	6.6		Bus	0.0
	Other	0.0		Taiwan High Speed Rail	10.3
Non-agriculture-related occupation	Service	12.0		Taxi	4.7
	Civil servant	8.0		Car	16.1
	Information industry	8.0		Walk	0.0
	Finance	8.0		Other	0.0
	Household	20.0	Visit partner	Self	1.6
	Industry	20.0		Family/relatives	2.6
	Medical supervision	0.0		School group	40.9
	Student	20.0		Travel group	14.0
	Retired	4.0		Colleagues group	37.8
Years of service	1 year or below	17.8		Friends	3.1
	2–5 years	24.3		Other	0.0
	6–10 years	19.6	Visit channels	Seek out networks	1.9
	11 years or above	38.3		Get to know the work	51.4
No. of visit	1 time	63.6		Referral by agricultural system	18.7
	2–5 times	29.0		Referral by friends/relatives	3.7
	6–10 times	0.9		Other	24.3
	11 times or above	6.5			

[z] Sample size of data is 193.

表 2. 農業試驗所參訪者參觀動機分析。

Table 2. The analysis for the motivation of guests visiting TARI.

Assay	Mean[z]	SD	Mean sorting
Academic motivation			
Out of curiosity	4.22	0.79	1
To see unique exhibition	4.09	0.87	2
To inspire creativity	3.81	0.96	3
To understand agriculture	3.80	0.97	4
To find fulfillment	3.50	0.97	9
For relaxing	3.32	1.22	10
To seek for inspiration	3.20	1.09	11
Organizational motivation			
To experience the unique atmosphere	3.79	0.98	5
To see famous exhibition	3.68	1.13	6
To recall memories	3.04	1.10	12
Recommended by friends and families	2.96	1.11	13
Visit when passing through	2.25	1.01	14
Operating motivation			
Work requirements	3.61	1.01	7
Class requirements	3.51	1.02	8

[z] Mean and standard deviation (sample size = 193) of scores from 5-point scales of “strongly agree, agree, neutral, disagree, strongly disagree” (5, 4, 3, 2, 1) respectively.

是由於工作上的需求，如「因為工作機構的要求」及「因為上課需要」(分別排序第 7 及 8)。由此可以看出，受訪者參觀農試所傾向以觀摩學習動機為主，首重技藝提升的層面，其次則是受到此一環境的特質所驅使及工作上的需求。

對解說媒體之預期想法與實際體驗的差異性分析

從表 3 得知，參訪者對於農試所各項解說媒體的預期想法認為重要的程度平均介於 3.99–4.19，在「普通」到「重要」之間，總平均 4.04，而實際體驗後的表現滿意程度平均介於 3.94–4.05，在「普通」到「滿意」之間，總平均 4.02，兩者皆偏於正向的想法，整體而言參訪者肯定本所解說媒體的表現，皆普遍表達「滿意」。但若針對解說媒體 (解說牌、影視播放、參觀指引、解說員) 共 20 個評估變項分別來看，參訪者之預期想法 (重要程度) 與實際體驗 (表現程度) 兩者間經 t 檢定之統計分析結果，發現存在顯著 ($P < 0.05$) 或極顯著 ($P < 0.01$) 之落差者，仍有 7 項，其中針對「解說牌設計」的「解說文字大小適中」覺得表現極顯著高於預期，但「解說牌設計顏色和背景協調」表現卻顯著不如預期；對於「影視播放」的「播放的內容長度適中」表現極顯著低於預期，而對於「播放的內容有趣並具有創意」表現極顯著高於預期；對於「解說人員」的「解說時間掌控的很好」與「說話音量及速度適中」的表現極顯著不如預期，而「解說具有啟發性」表現則極顯著高於預期；參訪者對於解說媒體其餘各項評估變項的預期想法與實際體驗間則皆無顯著差異。

進而將上述 20 個解說媒體評估變項，經 IPA 繪製成一個 2 維空間座標圖，並根據預期想法與實際體驗之總平均值為分隔點，將座標圖切割成 4 個象限，如圖 3 所示，以探討參訪者對農試所解說媒體之重要程度與表現程度間之關係，並作為改善之依據。由圖 3 得知，「解說牌設計」的「1. 內容難度適中」及「2. 內容

表 3. 農業試驗所參訪者對解說媒體使用前期望與使用後實際體驗統計。

Table 3. Difference between the visitors' expectation and the real experience after using TARI interpretive devices.

	Expectation		Real experience			
Item	Mean[z]	SD	Mean	SD	Diff.[y]	t-test significance
Design of poster						
1. The content is proper for understanding	4.11	0.77	4.09	0.83	-0.02	ns[x]
2. The content is clear for display	4.12	0.80	4.10	0.75	-0.02	ns
3. The font of poster is proper	3.94	0.83	4.11	0.77	0.17	**
4. The color of poster is well-coordinate with the background	3.87	0.81	3.73	0.83	-0.14	*
Video playing						
5. The length of video is proper	4.10	0.81	3.82	0.84	-0.28	**
6. The video is easy for understanding	4.13	0.80	4.11	0.75	-0.02	ns
7. The content of video is abundant and deep	4.11	0.78	4.08	0.82	-0.03	ns
8. The content is interesting and creative	3.88	0.84	4.05	0.77	0.17	**
Visit guidelines						
9. Shows the contents on display	4.01	0.76	3.94	0.78	-0.07	ns
10. Easy to obtain	3.87	0.80	3.79	0.75	-0.08	ns
11. Easy to carry	3.94	0.82	3.85	0.82	-0.09	ns
12. Worth conserving	4.12	0.87	4.19	0.91	0.07	ns
The docent						
13. Controls guiding time well	4.13	0.78	3.94	0.73	-0.19	**
14. The guiding matches the exhibition	4.12	0.80	4.11	0.75	-0.01	ns
15. The volume and speed of speaking are proper	4.05	0.79	3.86	0.82	-0.19	**
16. The guiding is inspiring	3.79	0.84	4.09	0.82	0.30	**
17. The docent is friendly	4.21	0.81	4.15	0.85	-0.06	ns
18. The docent wears identification badge and is well-groomed	4.11	0.84	4.21	0.76	0.10	ns
19. The docent is professional	4.07	0.84	4.13	0.82	-0.06	ns
20. It raises the interest in agriculture	4.02	0.87	4.01	0.83	0.10	ns
Total average	4.04		4.02			

[z] Mean and standard deviation (sample size = 193) of scores from 5-point scales of "very important, important, normal, unimportant, very unimportant" for expectation or "very satisfied, satisfied, normal, dissatisfied, very dissatisfied" for real experience (5, 4, 3, 2, 1), respectively.

[y] Diff., difference of mean score between expectation and real experience.

[x] *, ** Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively; ns, non-significant at 0.05 level.

足以清楚說明展示品」應該繼續保持 (落在第 1 象限)，而「4. 解說牌設計顏色和背景協調」所需改善優先順序較低 (落在第 3 象限)，「3. 解說文字大小適中」已能滿足參訪者需求 (落在第 4 象限)；「影視播放」的「6. 播放的內容易於瞭解」與「7. 播放的內容豐富且具有深度」應該繼續保持 (落在第 1 象限)，「5. 播放的內容長度適中」是應該加強改善的重點 (落在第 2 象限)，「8. 播放的內容有趣並具有創意」能滿足參訪者需求 (落在第 4 象限)；「參觀指引」的「12. 具有保存價值」應該繼續保持 (落在第 1 象限)，「9. 關於展示內容的說明」、「10. 容易取得」及「11. 攜帶方便」在改善進程之優先順序較低 (落在第 3 象限)；「解說人員」的「14. 解說內容符合展示主題」、「17. 解說人員的服務態度親切」、「18. 解說人員儀表整潔並有識別標誌」及「19. 解說人員的專業素養」應該繼續保持 (落在第 1 象限)，「13. 解說時間掌控

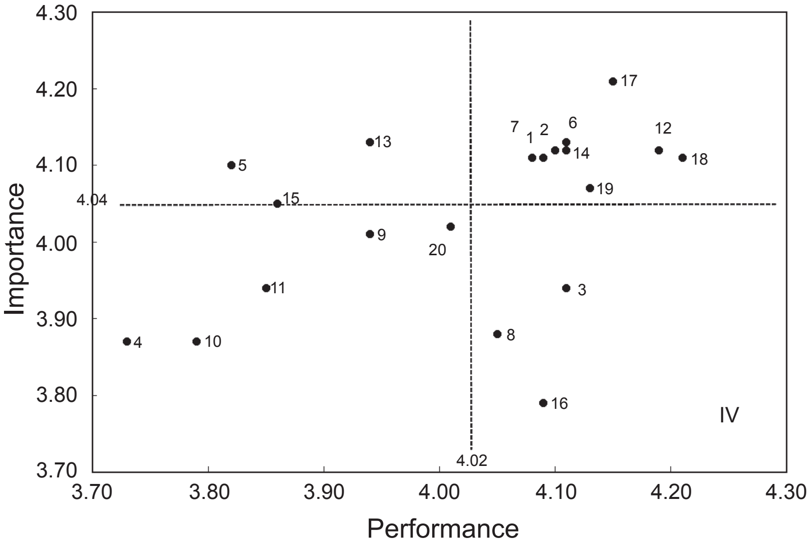

圖 3. 農業試驗所參訪者對解說媒體 20 個項目預期-實際座標圖 (如表 3 所示)。

Fig. 3. Importance-performance analysis of visitors on 20 interpretive service items provided by TARI. Item labels of 1–20 are defined as Table 3.

的很好」與「15. 說話音量及速度適中」應該加強改善 (落在第 2 象限)，「20. 能提升我對農業環境的興趣」所需改善之優先順序較低 (落在第 3 象限)，「16. 解說具有啟發性」已滿足參訪者需求 (落在第 4 象限)。

參訪服務之整體滿意度成效分析

本研究將參訪服務之整體滿意度成效區分為 5 大構面：訪前預期成效、訪前接洽服務滿意度、訪後滿意度、服務方式滿意度 (包括行程主題、場地及導覽人員等安排) 及訪後實際成效 (包括參訪者認為對個人或工作的幫助性、會再度來訪及會向別人推薦)，依據 5 點量表問卷調查之結果分析。如表 4 所示，發現所有構面的滿意程度或成效程度，皆介於滿意與非常滿意之間、或實用與非常實用之間。其中參訪者在訪前預期成效之期待甚高，總是希望能獲得實用甚至非常實用之資訊 (平均成效程度為 4.31)；對於來訪前農試所服務窗口人員所提供之接洽服務品質以及訪後實際體驗服務情形，皆感覺非常滿意 (平均滿意度分別為 4.55 及 4.45)；至於農試所服務方式，受訪者皆回答滿意或非常滿意，尤其對於導覽人員安排的滿意度最高，其次為場地安排及行程主題安排；在訪後實際成效方面，參訪者對於參訪後之反應皆甚佳，認為有利於個人或工作的平均滿意程度為 4.18，顯示參訪者一致覺得農試所提供的參觀資訊相當實用，同時也表達願意再度來訪與向別人推薦，其平均願意程度分別為 4.51 與 4.45。

參訪者基本資料對整體滿意度成效之影響分析

本研究進而將上述來所參訪實際體驗後的 3 個構面之整體成效 (訪後滿意度、服務方式滿意度及訪後實際成效)，根據參訪者不同的性別、年齡、教育程度、工作年資及參訪次數，經由 t 檢定或 ANOVA 之統計顯著差異性分析，以瞭解參訪者這些不同基本資料或特性對於本所解說服務表現是否會有不同的反應，結果顯示該 3 個構面在所有基本資料及特性皆無顯著差異 (分析結果未列表)，此意味著不同類型參訪者對農試所提供之解說服務都呈現相當一致的看法。

討論

綜合本研究分析結果，參訪者對於農試所提供之解說服務皆持以正面與肯定的回應，尤

表 4. 農業試驗所受訪者對於導引服務滿意程度分析。

Table 4. The analysis of visitor satisfaction of TARI guiding service.

Item	Mean[z]	SD
Expected service satisfaction	4.31	0.61
Pre-visiting contact	4.55	0.54
Satisfied after visiting	4.45	0.50
Service Mode		
Topic arrangement	4.37	0.51
Place arrangement	4.42	0.53
Docent arrangement	4.63	0.49
Effectiveness of the service		
Personal/working-helpful	4.18	0.64
Willing to visit again	4.51	0.57
Would recommend others to visit	4.45	0.57

[z] Mean and standard deviation (sample size = 193) of scores from 5-point scales of "very satisfied, satisfied, normal, dissatisfied, very dissatisfied" or "very practical, practical, plain, little help, helpless" or "strongly willing, willing, no opinion, unwilling, strongly unwilling" (5, 4, 3, 2, 1), respectively.

其針對展示品項之內容豐富、製作精美詳細、兼具專業與科普知識、試驗設備完善及具教育意義等面向留下深刻印象。此外，參訪行程安排佳、導覽解說專業熱情親切且團隊默契佳、環境乾淨整潔優美等優點皆讓訪賓感受獲益良多，因此期待有機會再次參訪並推薦他人造訪，此等效益可以增強訪客與本所間相互研究合作關係。

整體而言，參訪者對於農試所提供之解說服務成效皆給予極大的迴響。在農試所解說媒體的 20 項服務評估變數中，表現滿意度顯著或極顯著不如預期者，只有「解說牌設計」的「解說牌設計顏色和背景協調」、「影視播放」的「播放的內容長度適中」、「解說人員」的「解說時間掌控的很好」與「說話音量及速度適中」(表 2)，進而根據 IPA 分析，「解說牌設計顏色和背景協調」屬於優先順序較低的非急迫改善項目，但其他 3 項則均落於應該加強改善之象限 (圖 3)，認為簡報時間及解說時間可以再短，解說人員的音量與速度應更清晰及適中。此外，在回收問卷調查中，本研究發現有部分參訪者在其中 7 項的滿意度皆低於 4.00 分 (未達「滿意」水準)，所提出之建議包括：可縮短多媒體簡報時間、展示內容可再多元及活潑化等；而有些參訪者在問卷內其他說明項也以文字描述有待改善處，如：從台中市區或烏日高鐵站至農試所之交通不便問題、展場空調溫度過高、新養蟲室場域與參觀項目規格太小，建議擴大規模及可設置產品展售區 (如新品種販售或新技術成品推廣)，此等都是農試所未來應考量改善的方向，將秉持精益求精之思維，提出因應對策，以提升參訪者滿意度。

不同類型參訪者對於參訪實際體驗後的 3 個構面之整體成效 (訪後滿意度、服務方式滿意度及訪後實際成效) 皆無顯著差異，可說明不同類型參訪者對農試所提供之解說服務都一致認可肯定。在農試所服務方式評價中，全部參訪者一致對「導覽人員安排」表達出滿意程度最高 (表 4)，顯示至目前為止，該項服務品質績效良好。服務業產品具有異於其他產業之特殊屬性，其主因在於「人員」是影響服務品質之關鍵因素，並呈現出無形性 (intangibility) 與不可分割性 (inseparability)，因而服務人員於其服務歷程中展現出之忠誠、誠懇及專業技巧等不同程度之精神與行為，實攸關服務品質之水平。由於服務是一件神經緊繃的工作，導覽人員的人格特質必須具備較好的社交技巧 (高 EQ)、工作傾向、親和性及積極性，要個性外向開放，且應認知服務並非是一件自找麻煩的工作，要能為別人多想一點，少有個人主義之意見，因太多意見難辦事，因此針對服務人員的教育訓練，有其必要性及積極度。農試

所之外賓參訪服務採固定專人服務，由於大部分為特定主題式參訪，且以來自農業單位、農學院校、行政機關及民間組織等團體占多數，導覽人員的專業素質尤其重視；且基於近年來國外訪賓日漸趨多，人員的外語能力更顯重要，目前尤以日本外賓占多數，須強化日文導覽人才培養。

綜言之，參訪之成效為整體成果的呈現，搭配環境、人員素質、研發成果等各種面向皆需完善所達成之結果，農試所之研發成果涵蓋農業議題領域廣泛、組織完整、研究與資訊豐富且多樣，故而得到參訪者極大之評價。今後亦將以「親切友善、專業化服務」為願景，提供寓教於樂之優質展示環境，強化對社會與經濟之貢獻。

服務品質是由使用者的「認知品質」與「期望品質」之間的差異來決定。若認知品質高於期望品質，則服務品質的評價就會高，反之服務品質的評價變低；另服務人員之服務態度對服務品質亦有影響 (Heskett *et al*. 1997; Lin 2005; Lin & Lin 2013)。在服務品質之相關模型中，最具代表性且最受廣泛採用者，當屬 Parasuraman *et al*. (1985) 提出的服務品質模式，其內容包含 5 道服務缺口 (service gap)：(1) 使用者期望與管理者之認知差距；(2) 管理單位認知與服務品質標準之差距；(3) 服務品質標準與服務傳送之差距；(4) 服務傳送與外部溝通之差距；(5) 認知服務與期望服務之差距。Zeithaml *et al*. (1990) 認為進行使用者滿意度調查與建立正確服務品質標準，是消除服務缺口之策略；使用者對展示單位服務品質的高滿意度，是建立使用者忠誠度與長期競爭優勢的基石。因此，透過使用者滿意調查，可真正瞭解使用者期望與認知差距，並致力縮小差距，將有助於消除服務缺口。Lovelock & Wright (2002) 更將服務缺口擴充為 7 個，將媒體傳送缺口 (缺口 4) 分為媒體傳送缺口與媒體解讀缺口 (新增缺口 6)，並將使用者認知缺口 (缺口 5) 分為使用者認知缺口與使用者期望品質缺口 (新增缺口 7)。整體而言，服務品質是使用者滿意之重要因素，探究服務品質，可提升服務品質可靠度與增強企業競爭優勢 (Berry & Parasuraman 1991; Zeithaml & Bitner 2000; Malcolm & Ramsey 2014; Pokryshevskaya & Antipov 2014)。基此，針對農試所服務缺口之改善策略，本研究建議可從以下 3 點著手：(1) 制定服務標準作業程序 (SOP) 做為服務規範，透過一致性的服務品質提供，以消除服務缺口，進而讓參訪者留下優良的意象；(2) 持續定期進行參訪者滿意調查，透過回饋與溝通，瞭解參訪者期待與行為模式，可增加新參訪對象並提高參訪者再度造訪或向他人推薦之意願；(3) 加強導覽人員教育訓練，充實服務人員之專業知能與正確服務觀，以提升服務品質。

引用文獻

Aktas, A., A. A. Aksu, and B. Cizel. 2007. Destination choice: An important-satisfaction analysis. Qual. Quant. 41:265–273.

Alexandra, C. 2012. Facilitating reef tourism management through an innovative importance-performance analysis method. Tour. Manage. 33:767–775.

Azzopardia, E. and R. Nash. 2012. A critical evaluation of importance-performance analysis. Tour. Manage. 35:222–233.

Bailey, J. E. and S. W. Pearson. 1983. Development of a tool for measuring and analyzing computer user satisfaction. Manage. Sci. 29:530–545.

Baker, D. A. and J. L. Crompton. 2000. Quality, satisfaction and behavioral intentions. Ann. Tour. Res. 27:785–804.

Berry, L. L. and A. Parasuraman. 1991. Marketing Science: Competing through Quality. The Free Press. New York. 205 pp.

Binter, M. J. 1990. Evaluating service encounters: The effect of physical surroundings and employee response. J. Marketing. 54:69–82.

Bolton, R. N. and J. H. Drew. 1991. A multistage model of customers' assessments of service quality and value. J. Consumer Res. 17:75–84.

Chapman, R. G. 1993. Brand performance comparatives. J. Products Brand Manage. 2:42–50.

Cheron, E. J., R. McTavish, and J. Perrien. 1989. Segmentation of bank commercial markets. Intern. J. Bank Marketing 7:25–30.

Chiang, C. H. 2007. Evaluation of Importance and Performance of the Interpretation of Marine Environment: A Case Study of Penghu Aquarium. Master thesis, Department of Tourism Management, Chinese Cul-

ture University. Taipei. 93 pp. (in Chinese with English abstract)

Chiang, Y. C. 2002. Using the Technique of Importance-Performance Analysis to Evaluate Interpreters and Interpretive Media in National Science and Technology Museum. Master thesis, Graduate Institute of Environmental Education, Taichung Teachers College. Taichung. 167 pp. (in Chinese with English abstract)

Chu, R. K. S. and T. Choi. 2000. An importance-performance analysis of hotel selection factors in the Hong Kong hotel industry: A comparison of business and leisure travelers. Tour. Manage. 21:363–377.

Cronin, J. J. and S. A. Taylor. 1992. Measuring service quality: A reexamination and extension. J. Marketing 56:55–68.

Cronin, J. J. and S. A. Taylor. 1994. SERVPERF versus SERVQUAL: Reconciling performance-based and perceptions-minus-expectations, measurement of service quality. J. Marketing 58:125–131.

Engel, J. F., R. D. Blackwell, and P. W. Miniard. 1995. Consumer Behavior. 7th ed. The Dryden Press. New York. 789 pp.

Feng, M. Y., J. Mangan, C. Wong, M. Z. Xua, and C. Lalwani. 2014. Investigating the different approaches to importance-performance analysis. Service Industries J. 34:1021–1041.

Hemmasi, M., K. C. Strong, and S. A. Taylor. 1994. Measuring service quality for strategies planning and analysis in service firms. J. Appl. Business Res. 10:24–34.

Heskett, J. L., W. E. Sasser, Jr, and L. A. Schlesinger. 1997. The Service Profit Chain. The Free Press. New York. 320 pp.

Hollenhorst, S., D. Olson, and R. Fortney. 1992. Use of importance performance analysis to evaluate state park cabins: The case of the West Virginia State Park System. J. Park Recreat. Admin. 10:1–11.

Holzer, M., E. Charbonneau, and Y. Kim. 2009. Mapping the terrain of the public service quality improvement: Twenty-five years of trends and practices in the United States. Intern. Rev. Admin. Sci. 75:403–418.

Hooper, D. J. and K. Weiss. 1987. Interpretation as management tool. Legacy 2:10–16.

Joshi, K. 1992. A causal path model of the overall user attitudes toward the MIS function: The case of user satisfaction. Inform. Manage. 22:77–88.

Kang, M. S. and E. J. Song. 2014. A study on the real-time survey system for customer satisfaction. Adv. Sci. Techno. Lett. 46:29–33.

Kotler, P. 1999. Marketing Management: Analysis, Planning, Implementation, and Control. 10th ed. Prentice-Hall. Upper Saddle River. 816 pp.

Kozak, M. and K. Nield. 1998. Importance-performance analysis and cultural perspectives in Romanian Black Sea resorts. Anatolia Intern. J. Tour. Hospit. Res. 9:99–116.

Liao, W. R. 2013. Using importance-performance analysis (IPA) to assess the quality of services at the Museum of Contemporary Art, Taipei. Technol. Museum Rev. 17:5–26. (in Chinese with English abstract)

Lin, C. H. 2005. A Study on Visitors' Satisfaction at the Recreation Farms. Master thesis, Graduate School of Marketing Management, National Chung Cheng University. Chiayi. 91 pp. (in Chinese with English abstract)

Lin, C. T. and C. W. Lin. 2013. Exhibitor perspectives of exhibition service quality. J. Convent. Event Tour. 14:293–308.

Liu, W. Y., Y. H. Liu, S. Y. Huang, and H. Z. Wen. 2010. Measuring the relationship between customers' satisfaction and cognitions: A case of Janfusun Fancyworld in Taiwan. World Acad. Sci., Engine. Technol. 71:859–865.

Lovelock, C. and L. Wright. 2002. Principles of Service Marketing and Management. 2nd ed. Prentice-Hall. New York. 436 pp.

Malcolm, C. D. and D. Ramsey. 2014. Specialization and importance-performance in visitors to a Natural History Museum: The Canadian Fossil Discovery Centre. Euro. J. Tour. Hospital. Recreat. 5:9–34.

Martilla, J. A. and J. C. James. 1977. Importance-performance analysis. J. Marketing 41:77–79.

Nunnally, J. C. 1978. Psychometric Theory. 2nd ed. McGraw-Hill. New York. 701 pp.

O'Sullivan, E. L. 1991. Marketing for Parks, Recreation, and Leisure. Venture. State College. 271 pp.

Oliver, R. L. and W. S. DeSarbo. 1988. Response determinants in satisfaction judgments. J. Consumer Res. 14:459–507.

Parasuraman, A., V. A. Zeithaml, and L. L. Berry. 1985. A conceptual model of service quality and its implications for future research. J. Marketing 49:41–50.

Parasuraman, A., V. A. Zeithaml, and L. L. Berry. 1988. SERVQUAL: A multiple-item scale for measuring consumer perceptions of service quality. J. Retailing 64:12–40.

Parasuraman, A., V. A. Zeithaml, and L. L. Berry. 1994. Reassessment of expectations as a comparison standard in measuring service quality: Implications for further research. J. Marketing 58:111–124.

Pitt, L. F., R. T. Watson, and C. B. Kavan. 1995. Service quality: A measure of information system effectiveness. MIS Quart. 19:173–187.

Pokryshevskaya, E. B. and E. A. Antipov. 2014. The comparison of methods used to measure the importance of service attributes. Intern. J. Market Res. 56:283–296.

Pu, C. C. 2014. Museum service quality: A case study of the National Science and Technology Museum. Technol. Museum Rev. 18:39–65.

Sampson, S. E. and M. J. Showalter. 1999. The performance-importance response function: Observations and implications. Serv. Indust. J. 19:1–25.

Sethna, B. N. 1982. Extensions and testing of importance-performance analysis. Business Econ. 17:28–31.

Sharpe, G. W. 1982. An overview of interpretation. p.2–26. *in*: Interpreting the Environment. 2nd ed. (Sharpe, G. W., ed.) Wiley. New York. 710 pp.

Sörenssona, A. and Y. von Friedrichs. 2013. An importance-performance analysis of sustainable tourism: A comparison between international and national tourists. J. Destin. Market. Manage. 2:14–21.

SPSS Inc. 2007. SPSS Statistics Base 17.0 User Guide. SPSS Inc. Chicago. 616 pp.

Susan, F. 2002. Book review: Secrets of customer relationship management: It's all about how you make them feel. J. Serv. Marketing 16:700–703.

Teas, R. K. 1993. Expectations, performance evaluation and consumer's perception of quality. J. Marketing. 57:18–34.

Tilden, F. 1977. Interpreting Our Heritage. 3rd ed. The University of North Carolina Press. Chapel Hill. 119 pp.

Wang, H. C. 2001. An Importance-Performance Analysis of the Quality of the Museum: Case Study of the National Palace Museum. Master thesis, Department of Tourism Management, Chinese Culture University. Taipei. 114 pp. (in Chinese with English abstract)

Wu, H. C. 1997. Evaluation of Interpretation: Effectiveness of the Interpretive Exhibit Centers in Taroko National Park, Taiwan. Doctoral dissertation, Stephen F. Austin State University. Nacogdoches. 357 pp.

Wu, H. C. and W. L. J. Chen. 2005. A 20 years overview and prospect of graduate interpretive research in Taiwan: 1984–2003. J. Interpretation Res. 10:59–66.

Wu, H. C. and Y. C. Chiang. 2004. Exploring visitors' satisfaction on the interpretive media at National Science and Technology Museum. J. Natl. Taichung Teach. College 18:159–183. (in Chinese with English abstract)

Wu, H. H. and J. I. Shieh. 2009. The development of a confidence interval-based importance performance analysis by considering variability in analyzing service quality. Expert Syst. Appl. 36:7040–7044.

Zeithaml, V. A. and M. J. Bitner. 2000. Service Marketing: Integrating Customer Focus across the Firm. 2nd ed. McGraw-Hill. New York. 608 pp.

Zeithaml, V. A., A. Parasurman, and L. L. Berry. 1990. Delivering Quality Service. The Free Press. New York. 219 pp.

Using Importance-Performance Analysis to Evaluate the Effectiveness of the Interpretive Media in Taiwan Agricultural Research Institute

Shu-Fen Shiau[1], Yu-Shih Hsieh[2], and Lit-Fu Chan[2,*]

Abstract

Shiau, S. F., Y. S. Hsieh, and L. F. Chan. 2015. Using importance-performance analysis to evaluate the effectiveness of the interpretive media in Taiwan Agricultural Research Institute. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):213–227.

In addition to the domestic agricultural studies, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) also focused on the exhibition of research and development achievements to highlight the work scheme and effectiveness. The five-point Likert scale questionnaire survey of the satisfaction of visitors in 2013 was designed for a better understanding of their views on our exhibition content and guide service. There were 193 valid returned questionnaires in total, which the effective response rate was 93.2%. The research results indicated that the main motivation of visit was learning, other reasons included being attracted by the characteristics of TARI and work requirements. After the visit, the visitors showed positive response to the guide provided by TARI and felt satisfied with it in common. Among the 20 service evaluation variables, "design of poster- the font of poster is proper," "video playing- the content of video is interesting and creative" and "the docent- the guide is inspiring" were obviously better than expectation. With the importance-performance analysis, we discovered the satisfaction of "video playing- the length of video is proper," "the docent- time control of the guide" and "the docent- the volume and speed of speaking are proper" were below expectation and worth improving. As to the overall service, the satisfaction of "the arrangement of docents" was identically the highest (4.63 ± 0.49). The satisfaction of the benefit for work after visiting was 4.18 ± 0.64, the willing for visiting again or recommending to others was 4.51 ± 0.57 and 4.45 ± 0.57, which revealed the fruitful achievements of TARI. With data analysis of this survey, we may not only understand the visitors' expectation and satisfaction of the quality of our guide service, but also clarify the service gap for further improvement.

Key words: Importance-Performance analysis, Interpretation media, Satisfaction questionnaire, Motivation analysis, Service gap.

Received: October 21, 2014; Accepted: February 26, 2015.
* Corresponding author, e-mail: leevchan@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Associate Research Fellows, Technical Service Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):228–238 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.07

研究報告

未經冷馴化之草莓腋芽超低溫冷凍保存研究

蕭翌柱[1,*] 陳冠文[2]

摘要

蕭翌柱、陳冠文。2015。未經冷馴化之草莓腋芽超低溫冷凍保存。台灣農業研究 64(3):228–238。

草莓 (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) 在全世界已有超過 70 個以上的國家進行栽培與量產，其為薔薇科 (Rosaceae) 多年生高經濟作物之一，因此進行種原的長期保存益顯重要，本試驗主要目的即在建立未經冷馴化草莓 (「桃園 1 號」) 腋芽最適宜的超低溫冷凍保存方法。腋芽培植體 (芽體尺寸 1–2 mm) 在尚未浸入 -196℃ 液態氮前之預處理結果顯示：(1) 預培養於添加 0.3 M 蔗糖之 MS 基本鹽類培養基 14 d 後，平均存活率為 96.7% ± 5.8%；(2) 將填充溶液 (LS) 中的蔗糖濃度自 0.6 M 提升至 1.6 M 並且滲透壓保護 90 min，腋芽的平均存活率仍可達到 100%；以及 (3) 腋芽使用植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 脫水處理 60 min 後，平均存活率達到 86.7% ± 4.7%，此百分比顯著高於脫水處理 180 min (46.7% ± 4.7%) 和 240 min (46.7% ± 17.0%) 的處理組。含有腋芽的藻膠球繼代培養 14 d 後的存活率可達到 66.7–80%。經比較後各處理之間並無顯著差異，故本研究各項結果有助於簡化草莓腋芽超低溫冷凍保存的方法。

關鍵詞：草莓、超低溫冷凍保存、填充溶液、滲透壓保護、植物玻璃質化溶液 2。

前言

草莓 (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) 原產於歐洲及南美洲等地區，為一種具有匍匐莖之多年生薔薇科 (Rosaceae) 草莓屬 (*Fragaria*) 植物，現代常見的栽培種多是由 *F. chiloensis* L. P. Mill. 及 *F. virginiana* Duch. 2 個原始品種自然雜交而來。由於果實富有香氣、色澤討喜且口感酸甜適中，不但可用於鮮食，也能進行冷凍及加工處理；另外，草莓富含維生素 C、水楊酸、檸檬酸及具有美白效用的鞣花酸 (Ellagic acid) 等成分，故自古以來即廣受人們的喜愛。目前，全世界約有 71 個國家進行草莓的商業栽培，換算總栽培面積約有 204,771 ha (Sakila *et al*. 2007)。根據行政院農業委員會 2013 年《農業統計年報》記載，台灣草莓的總收穫面積約有 535 ha，其中又以苗栗縣所占的栽培面積最大 (484 ha)，其次是南投縣 (16 ha) 和新竹縣 (13 ha)，而苗栗縣的草莓種植面積約有 78% 集中於大湖地區，且仍是以「豐香」為主要商業品種。農糧署在 2013 年的調查資料顯示，苗栗縣草莓的生產費用 (包括種苗、肥料、農藥及工資等) 約為新台幣 985,515 元 ha^{-1}，若以平均產量 17,548 kg ha^{-1} 估算粗收益為 1,958,802 元 ha^{-1}，亦即每年的淨收益約可達到 973,287 元 ha^{-1}。由於國內生產的新鮮草莓是以供應本地市場需求為主，加上深受一般消費大眾的喜愛，使其成為一種具有高經濟價值的作物 (Shih *et al*. 2009; Tsai *et al*. 2009)，因此積極研究草莓健康種苗繁殖及種原保存技術也益顯重要。

世界各國設立的作物種原中心所採用的種原保存方式可區分為 3 種：(1) 在原生地進行現地保存；(2) 將種原移植後配合集約管理之

投稿日期：2014 年 11 月 6 日；接受日期：2015 年 3 月 10 日。
[*] 通訊作者：yjshiau@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所作物種原組研究助理。台灣 台中市。

離場保存；以及 (3) 利用組織培養等技術進行種原離體保存 (Engelmann 1991)。例如，日本北海道農業試驗機關即在網、溫室等設施內，以盆栽栽培保存 105 個草莓品種，但此種保存方式仍需定期進行補種和移植，以防止帶菌母株或走莖引發病害造成種原的損失 (Hirai *et al*. 1998)。近年來，隨著生物技術日新月異的發展，已與傳統的種原保護措施相結合，不但可以維持生物的多樣性並且能夠有效保存重要的物種資源，採用組織培養技術建立無菌培植體和繼代培養，也可以避免植物種原遭受病、蟲危害，導致遺傳資源喪失的風險 (Bajaj 1991; Reed *et al*. 2001)；另外，美國國家作物種原中心也利用組織培養或超低溫冷凍保存等方法，在低溫的環境中保存超過 350 個草莓品種 (Niino *et al*. 2003)。一般應用植物超低溫冷凍保存技術時，需先將培植體進行預培養和低溫冷馴化 (cold hardening)，再依序經過填充溶液 (loading solution; LS) 滲透壓保護 (osmoprotection) 和浸漬於植物玻璃質化溶液 2 (plant vitrification solution 2; PVS2) 脫水處理 (dehydration treatment) 等程序，最後才將植物莖頂、體胚或芽體等置入 -196℃的液態氮中長期保存。在此極度低溫下，植物器官或組織的生理代謝已接近停止狀態，但仍舊保有生命的活力 (Engelmann 2004)。前述方法具有減少保存種原耗用的土地空間和人力成本的優點，也能避免外在環境如溫度、降雨、日照、病害或蟲害等因子的干擾 (Keller *et al*. 2006)。

本研究係繼先前發表有關未經冷馴化草莓莖頂超低溫冷凍保存技術的論文後 (Shiau & Chen 2014)，持續探討未經冷馴化草莓 (「桃園 1 號」) 腋芽的超低溫冷凍保存方法。由於預備試驗結果顯示，腋芽的體積大小會影響培植體置入 PVS2 脫水處理後之存活率，因此本研究主要目的是探討未經低溫冷馴化之草莓腋芽在冷凍保存前的預培養程序。另外，取不同體積的腋芽進行不同時間的 PVS2 脫水處理，以檢測其對於培植體存活率之影響，最終則是將經過前處理的腋芽培植體置入液態氮中，經不同保存日數後取出進行培植體再生率比較以及最佳回溫時間之探討。彙整本研究各項試驗結果，將有助於簡化草莓腋芽超低溫冷凍保存的方法。

材料與方法

供試材料

本試驗所使用的草莓「桃園 1 號」品種係取自行政院農業委員會農業試驗所種原組，應用組織培養無性繁殖之草莓無菌苗則置於恆溫 21℃、38–40 μmol m^{-2} s^{-1} 光合成光子流量密度 (photosynthetic photon flux density; PPFD) 及光週期 14 h 的培養室，使用含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類、0.2 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BA)、0.1 M 蔗糖及 0.8% Difco 洋菜粉，pH 5.8 的固體培養基培養 2 mo。

預培養程序、腋芽之取得方法及培植體存活率之調查標準

將已去除葉片和葉柄並預培養 14 d 的草莓莖節自試管中取出，在解剖顯微鏡下切除莖頂分生組織後，再次預培養 7 d 以打破頂芽優勢促進腋芽萌生。預培養 7 d 後，切取莖節上已萌生的腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm)，並接種於固體培養基培養 3 d 後，即可作為試驗材料，前述預培養用之培養基含有 MS 基本鹽類、0.3 M 蔗糖及 0.8% Difco 洋菜粉，pH 5.8。另外，因先前的預備試驗顯示，供試培植體經高濃度蔗糖溶液或超低溫處理後再培養 14 d，即能明顯判斷培植體是否褐化死亡或維持翠綠色並回復生長，可據此作為下述各項試驗之腋芽培植體存活率調查標準。

不同蔗糖濃度預培養對腋芽存活率之影響

為檢測腋芽培植體在預培養時，對於培養基中蔗糖含量的耐受濃度，故先於無菌操作台內藉由解剖顯微鏡輔助切取腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm)，再分別接種於含有不同蔗糖濃度 (0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) 的 MS 固體培養基上，且以添加 0.1 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基作為對照組，置於組織培養室培養 14 d 後，再調查各處理組之培植體存活率。

滲透保護及脫水處理對腋芽存活率之影響

包埋：供試培植體在進行滲透壓保護前需進行包埋處理；包埋溶液分為 A、B 兩種，其配方及包埋方法皆與作者前一篇論文 (Shiau & Chen 2014) 所述相同。

不同 LS 滲透壓處理對腋芽培植體存活率之影響：將包埋有腋芽培植體之藻膠球移至鋪有濾紙的培養皿上吸取殘餘的 B 溶液，再將藻膠球移至 2 mL 容量抗凍管，依試驗需求加入含不同蔗糖濃度的 LS，每支抗凍管添加 1 mL，供試之 LS 配方分別含有 2 M 甘油、不同蔗糖濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 或 1.6 M) 以及 MS 基本鹽類，pH 值為 5.8。在 25℃的環境溫度下滲透保護處理 90 min，每支抗凍管中有 10 個培植體。經滲透保護處理後的培植體，各依序以 1 mL 的 1.2、0.8、0.6 及 0.2 M 蔗糖濃度 MS 培養液浸漬清洗 10 min，使培植體內甘油成分降低、並漸進增加組織含水率，最後將藻膠球接種在 MS 固體培養基培養 14 d，觀察和紀錄各處理組之培植體存活率。

不同 PVS2 脫水時間對不同腋芽培植體存活率之影響：分別切取不同腋芽 (芽體尺寸小於 1 mm 和 1–2 mm) 作為供試材料，經包埋成藻膠球後，使用含蔗糖濃度 1.6 M 的 LS 滲透保護處理 90 min。再利用微量吸管個別吸取 1 mL PVS2 注入抗凍管，並在固定溫度 25℃的乾浴槽中分別脫水 60、120、180 及 240 min，PVS2 為含有 30% w/v 甘油、15% 二甲基亞碸 (DMSO)、15% 乙二醇及 0.4 M 蔗糖的 MS 無機鹽類營養液 (pH 5.8)。待處理完畢後將 PVS2 吸出，再依序以 1 mL 的 1.2、0.8、0.6 及 0.2 M 蔗糖濃度的 MS 培養液各浸漬清洗 10 min，最後，將藻膠球自抗凍管中取出，放置濾紙上吸取殘液後，先接種於含活性碳之 MS 培養基 (MS 基本鹽類 + 30 g L^{-1} 蔗糖 + 0.2 mg L^{-1} BAP + 1.0 g L^{-1} PVP + 3.0 g L^{-1} 活性碳 + 0.8% agar) 暗培養 1 d，再轉至 MS 再生培養基 (MS 基本鹽類 + 0.1 M 蔗糖 + 0.2 mg L^{-1} BAP + 0.8% agar) 培養 14 d，調查和比較各處理組之培植體存活率。

抗凍管內不同 PVS2 用量與凍存後回溫時間對腋芽培植體存活率的影響

取包埋單一腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 且依序經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 的藻膠球作為供試材料，將其置入 2 mL 容量之抗凍管中，每 1 支抗凍管置入 10 個藻膠球，再各別於抗凍管內加入不同用量 (0.3、0.5 及 1.0 mL) 的 PVS2 抗凍液，最後直接浸入液態氮中超低溫冷凍保存 1 h。再將上述 3 種含不同 PVS2 體積之處理組迅速置入 38℃恆溫水槽中，個別進行回溫處理 (60、90 及 120 s)。各處理組在回溫後使用之 MS 培養液清洗、暗培養以及 MS 再生培養基培養等程序，皆與前項試驗相同，培植體經培養 14 d 後，調查和比較各處理組之存活率。

液態氮凍存時間對腋芽培植體存活率的影響

取包埋單一腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 且依序經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 的藻膠球作為供試材料，每 1 支 2 mL 容量抗凍管內置入 10 個藻膠球，再各別於抗凍管內加入 0.3 mL 的 PVS2 抗凍液。最後，直接浸入液態氮中超低溫冷凍保存不同時間 (1 h、1 d、7 d、30 d 及 90 d) 後取出，再迅速置入 38℃恆溫水槽中回溫處理 60 s。各處理組在回溫後使用之 MS 培養液清洗、暗培養以及 MS 再生培養基培養等程序，皆與前項試驗相同，培植體經培養 14 d 後，調查和比較各處理組之存活率。

試驗統計分析

以上試驗每一處理皆重複 3 次，每 1 重複使用 10 個培植體，獲得的數據資料計算其算術平均值及標準差 (standard error; SE)，並以 SAS 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，在 5% 顯著性水準下以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 檢定各處理間差異的顯著性。

結果

不同蔗糖濃度預培養對腋芽培植體存活率之影響

草莓組織培養苗從試管中取出，先於無菌操作台內，在 10 倍放大倍率的解剖顯微鏡下切取腋芽組織 (芽體尺寸 1–2 mm)，分別接種在 0.1 M (Control)、0.2 M、0.3 M 及 0.4 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基進行預培養 14 d。經統計分析結果顯示，培養於前 3 項處理組的腋芽培植體存活率皆達到 96.7–100% (圖 1)，顯著高於含 0.4 M 蔗糖濃度處理組之 60% 存活率。

不同 LS 滲透壓處理對腋芽培植體存活率之影響

將包埋有單一腋芽培植體的藻膠球分別置入 2 mL 容量之抗凍管，並在各抗凍管中個別加入含不同蔗糖濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 及 1.6 M) 的 LS 溶液在 25℃的環境下滲透壓保護處理 90 min，再置於 MS 固體培養基培養 14 d。試驗結果顯示，腋芽培植體不論是使用含有 0.6 M 蔗糖濃度的處理組或是添加量達到 1.6 M 的處理組，調查試驗後培植體之存活率皆為 100% (圖表未提供)。

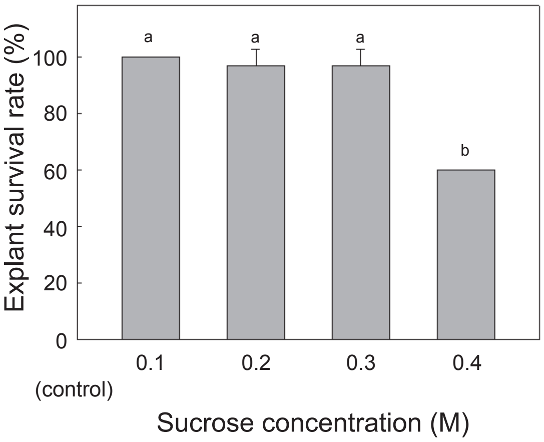

圖 1. 在含不同蔗糖濃度 (0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) MS 培養基預培養 14 d 之草莓「桃園 1 號」腋芽存活率。

Fig. 1. The survival rates of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') axillary buds precultured on MS medium with different sucrose concentrations (0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 M) for 14 d. Vertical bars indicate standard error (*n* = 3).

不同 PVS2 脫水時間對於不同腋芽培植體存活率之影響

不同芽體尺寸 (小於 1 mm 和 1–2 mm) 的腋芽材料，經個別包埋成藻膠球後，先使用含蔗糖濃度 1.6 M 的 LS 滲透保護處理 90 min，再利用微量吸管個別吸取 1 mL PVS2 注入抗凍管，並在固定溫度 25℃的乾浴槽中分別脫水處理 60、120、180 及 240 min，經 MS 培養液清洗後，在 MS 再生培養基培養 14 d。結果顯示，芽體尺寸小於 1 mm 的腋芽以 PVS2 脫水處理 60 min 後之存活率為 60.0% ± 8.2% (圖 2A)，顯著高於脫水 120 min (43.7% ± 4.7%)、180 min (33.3% ± 4.7%) 及 240 min (23.3% ± 4.7%) 之處理組。另外，若取芽體尺寸 1–2 mm 的腋芽以 PVS2 脫水處理 60 min 後之存活率則達到 86.7% ± 4.7% (圖 2B、圖 3)，略高於脫水 120 min 者 (66.7% ± 4.7%)，且顯著高於 180 min (46.7% ± 4.7%) 及 240 min (46.7% ± 17.0%) 之處理組。

抗凍管內不同 PVS2 用量與凍存後回溫時間對腋芽培植體存活率的影響

將包埋有單一腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 且經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 後的藻膠球置入 2 mL 容量之抗凍管中，在使用 -196℃液態氮進行凍存前，於抗凍管內先加入 PVS2 抗凍液 0.3 mL 且凍存 1 h 後取出迅速回溫 60 s (代號 RW60s) 的處理組。在培養 14 d 後，平均存活率為 76.7% ± 4.7% (表 1)，略高於加入 PVS2 0.5 mL (66.7% ± 12.5%) 或 1.0 mL (60.0% ± 0.0%) 之處理組；若是回溫時間 90 s (代號 RW90s) 時，抗凍管內加入 0.3 mL 新鮮 PVS2 抗凍液的處理組，其腋芽培植體平均存活率為 80.0% ± 8.2%，略高於加入 0.5 mL (66.7% ± 4.7%) 或 1.0 mL (63.3% ± 9.4%) 之處理組；當設定回溫時間為 120 s (代號 RW120s) 時，則抗凍管內加入 0.3 mL PVS2 抗凍液的處理組，其腋芽存活率僅有 63.3% ± 9.4%，其與加入 0.5 mL

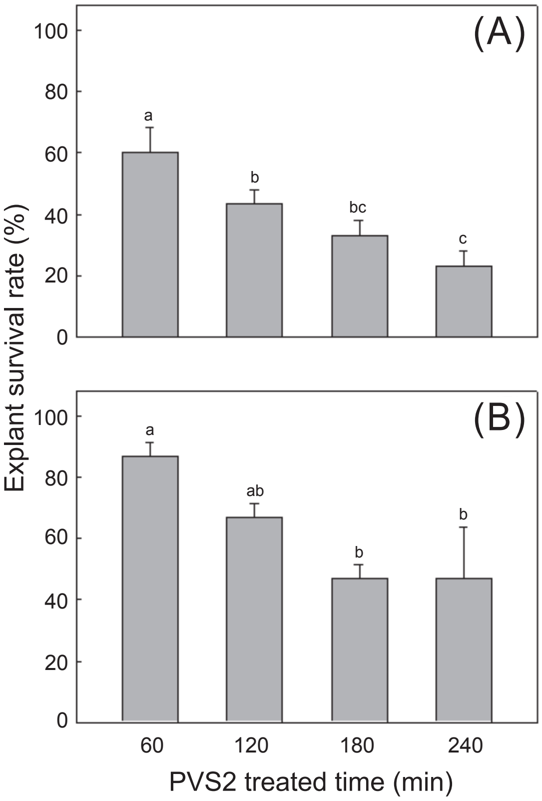

圖 2. 草莓 (「桃園 1 號」) 不同尺寸的腋芽 (A：小於 1 mm；B：1–2 mm) 以植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 浸漬不同時間 (60、120、180 及 240 min) 後的存活率。

Fig. 2. The survival rates of different sizes axillary buds of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') (A: less than 1 mm; B: 1–2 mm) after immersing in plant vitrification solution 2 (PVS2) for different time periods (60, 120, 180, and 240 min). Vertical bars indicate standard error (n = 3).

之處理組相似 (63.3% ± 4.7%)，但略低於加入 1.0 mL PVS2 之處理組 (80.0% ± 8.2%)。

液態氮凍存時間對腋芽培植體存活率的影響

將經過包埋且依序以 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min的腋芽 (芽體尺寸1–2 mm) 置入抗凍管中，再於抗凍管內加入 0.3 mL 的 PVS2 抗凍液，最後直接浸入液態氮分別超低溫冷凍保存不同時間 (1 h、1 d、7 d、30 d及 90 d) 後取出，迅速置入 38℃恆溫水槽中回溫處理 60 s。結果顯示，各處理組在回溫後，依序經過 MS 培養液清洗、暗培養以及 MS 再生培養基培養等程序，各處理組之存活率分別為 76.7% ± 4.7%、73.3% ± 9.4%、80.0% ± 16.3%、66.7% ± 9.4% 及 66.7% ± 9.4%。經比較和分析後，彼此間並無顯著差異 (圖 4)，此種經過超低溫冷凍保存之腋芽培植體，在繼代培養 7 mo 後，能發育成為根系強健的苗株 (圖 5)。

討論

自 1976 年由 Seibert 首度發表康乃馨莖頂超低溫保存研究後 (Bajaj 1991)，至今此一技術已被廣泛應用於更多的植物種類，例如，日本已建立甘藷、百合、柿子、梨、櫻桃、柑桔和櫻花等十數種植物之超低溫冷凍保存技術 (Niino 2006)。我國則以中興大學累積 15 年以上之研究經驗最具成效，試驗種類包括高氏柴胡、台灣黃岑、牛樟、番木瓜、鳳梨、葡萄、北蕉、山藥、甘藷以及原生種報歲蘭等。台灣大學則是探討香蕉體胚玻璃質化法超低溫保存之影響因子。植物種原應用超低溫冷凍保存所需的空間較之田間保存小，但培植體在以液態氮冷凍之前，需先藉助較高濃度的含糖溶液、LS 和 PVS2 進行預處理，以達到滲透壓保護和適度脫水的效果；另在解凍回溫過程中，也需儘量縮短時間並設法降低細胞間隙產生冰晶造成傷害，或是避免嚴重脫水導致原生質膜遭到破壞，以致喪失正常的生理機能。上述各項程序，被認為是影響玻璃質化冷凍保存技術成功與否的重要因素 (Thomashow 1999; Ashworth & Pearce 2002; Hirai & Sakai 2003)。例如，在室溫下，將龍膽屬植物幼苗先繼代培養數日後，再用二階段含高蔗糖濃度 (0.4 M 及 0.7 M) 的培養基各培養 1 d，可以增加腋芽培植體之存活率 (Suzuki *et al*. 2005)；若利用低溫逆境培養數週再搭配滲透逆境培養的方式，也能提升馬鈴薯等作物在超低溫冷凍保存後之存活率 (Hirai & Sakai 1999)。另外，在本項研究的預備試驗發現，在解剖顯微鏡下直接切取草莓休眠腋芽時，供試材料多小於 1 mm，且經過含高糖溶液處理後會影響腋芽之存活率。據學者研究指出，苗株在尚未去除葉

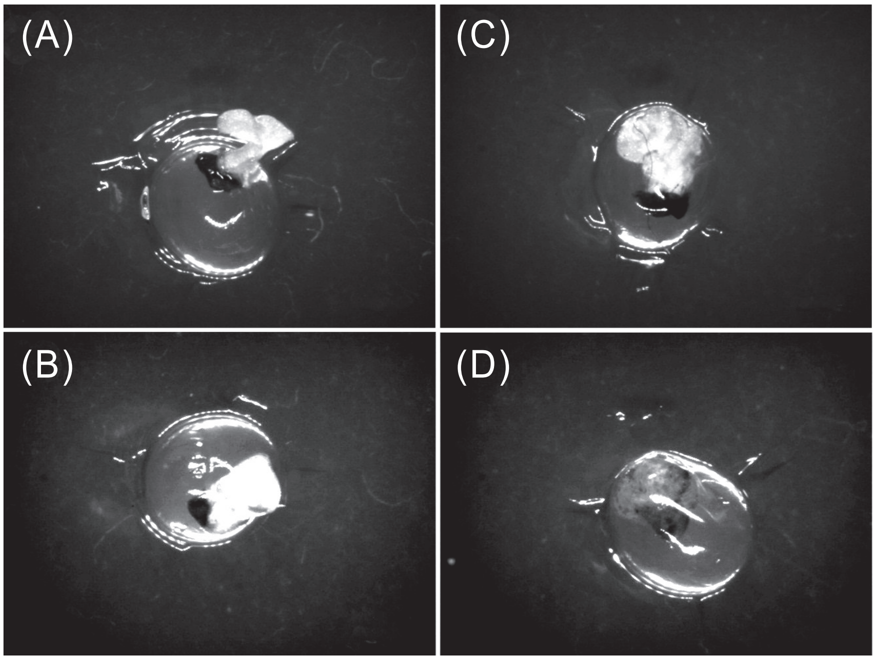

圖 3. 以 PVS2 溶液處理不同時間再培養 14 d 後之草莓「桃園 1 號」腋芽。(A) 60 min；(B) 120 min；(C) 180 min；(D) 240 min (比例尺 = 1 mm)。

Fig. 3. Recovery of axillary buds of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') after immersing in plant vitrification solution 2 (PVS2) for different durations and then cultured for 14 d. (A) 60 min; (B) 120 min; (C) 180 min; (D) 240 min (Scale bar = 1 mm).

表 1. 凍存管中不同植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 體積與液態氮凍存 1 h 後之回溫時間對於草莓「台農 1 號」腋芽存活率的影響。

Table 1. Effects of different volumes of plant vitrification solution 2 (PVS2) in cryotube and rewarming time on the survival rate of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') axillary buds after immersing in liquid nitrogen for 1 h[z].

	Axillary buds survival rate (%)		
PVS2 volume per cryotube (mL)	RW60s[y]	RW90s	RW120s
0.3	76.7 ± 4.7 a[x]	80.0 ± 8.2 a	63.3 ± 9.4 a
0.5	66.7 ± 12.5 a	66.7 ± 4.7 a	63.3 ± 4.7 a
1.0	60.0 ± 0.0 a	63.3 ± 9.4 a	80.0 ± 8.2 a

[z] The axillary buds were precultured on MS medium for 3 d, and then pretreated with 1.6 M loading solution (LS) for 90 min and PVS2 for 60 min before immerged into liquid nitrogen (-196℃). MS medium: MS basal salts + 102.6 g L^{-1} sucrose + 0.8% Difco agar, pH = 5.8. 1.6 M LS: MS basal salts + 184.18 g L^{-1} glycerol + 547.2 g L^{-1} sucrose, pH = 5.8. PVS2: MS basal salts + 136.8 g L^{-1} sucrose + 30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl sufoxide, pH = 5.8.

[y] RW60s: Each cryotube with axillary buds was rapidly rewarmed in a water bath at 38℃ for 60 s.

[x] Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test (*n* = 3).

片和莖頂分生組織時，仍具有頂芽優勢和抑制腋芽萌生的作用，故在一般情況下，潛伏於短縮莖節和葉腋之間的腋芽常處於休眠狀態，需待頂芽優勢打破或抑制其萌發的因素消除後，植物腋芽細胞的分裂能力才會增加 (Rubinstein & Nagao 1976)。因此，將去除葉片且預培養 14 d 的草莓莖節，在切取莖頂組織後，再度將短縮莖接種回原來的 MS 固體培養基並繼續培

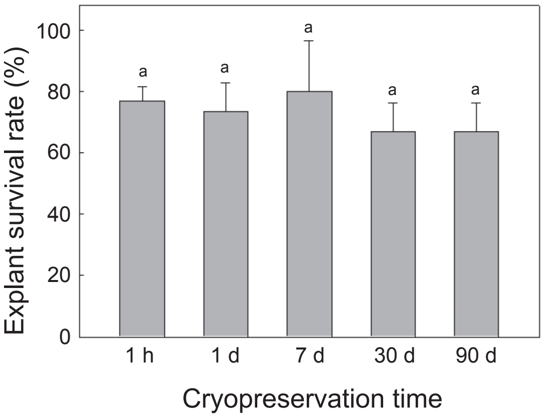

圖 4.　草莓「桃園 1 號」腋芽以液態氮處理不同時間 (1 h、1 d、7 d、30 d 或 90 d) 後的存活率。

Fig. 4.　The survival rates of axillary buds of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') after treated with liquid nitrogen for different durations (1 h, 1 d, 7 d, 30 d, or 90 d). Vertical bars indicate standard error (*n* = 3).

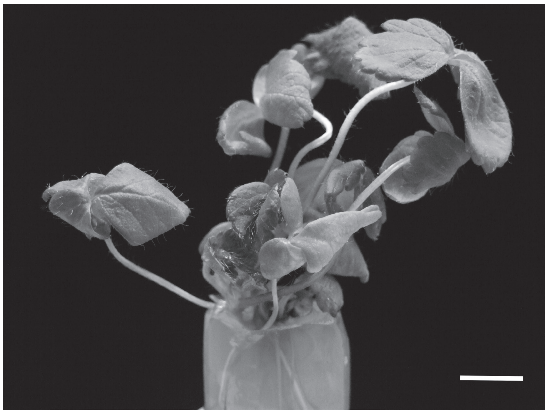

圖 5.　草莓「桃園 1 號」腋芽以液態氮超低溫冷凍保存 1 h，再回復生長及繼代培養 7 mo 後的苗株 (比例尺 = 1 cm)。

Fig. 5.　The plantlet of axillary buds of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') after treated with liquid nitrogen for 1 h and then recovered by growth and subculture for 7 mo (Scale bar = 1 cm).

養 7 d，能促使休眠中之腋芽萌生，待其發育至 1–2 mm 時，即可切取作為供試培植體，此也與筆者在前一篇論文 (Shiau & Chen 2014) 中直接切取草莓苗株莖頂組織作為試驗材料之取得方法不同。

草莓種原利用超低溫冷凍保存的程序，通常會先在 4–5℃、光週期 8 h 的環境下冷馴化 20–40 d，再以高蔗糖濃度的固體培養基預培養 1–2 d，另進行後續的滲透壓保護及脫水處理 (Ramírez *et al*. 2004; Niino 2006; Zhao *et al*. 2006; Medina *et al*. 2007)。或是先在室溫、光照周期 14 h 的環境預培養 25–30 d，再移至 10℃、光照周期 8 h 的環境下冷馴化處理 30 d (Hwang 2007)。換言之，其完成一項試驗所需的時間較長。本研究則是取未經低溫冷馴化的草莓 (「桃園 1 號」) 腋芽作為供試材料，由於幼嫩的腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 經過包埋且進行離體培養時，培植體並無葉片可行光合作用合成生長所需之碳水化合物，故需在 MS 培養基中添加蔗糖作為主要碳源，否則培植體的生長可能會受到影響。因此，Hirai *et al*. (1998) 在預培養草莓莖節時之培養基蔗糖濃度為 30 g L^{-1}，本項試驗則是以近似於 Hirai *et al*. (1998) 蔗糖用量之 0.1 M (34.2 g L^{-1}) 作為對照組；另為檢測腋芽培植體在預培養時，對於培養基中添加蔗糖的最高耐受濃度，因此使用含不同蔗糖濃度 (0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) 的 MS 固體培養基進行試驗。結果顯示，腋芽培植體接種在含有 0.1 M (Control)、0.2 M 和 0.3 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基預培養 14 d，其存活率可達到 96.7–100%，顯著高於含 0.4 M 蔗糖濃度處理組之 60% 存活率 (圖 1)，據此得知腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 在應用超低溫冷凍保存前的預培養期間，可適度提高蔗糖濃度至 0.3 M，使其先行適應較低含水量的培養環境，此也與使用莖頂 (Shiau & Chen 2014) 作為培植體的試驗結果相似。另外，Matsumoto *et al*. (1998) 曾研究指出，植物組織以 PVS2 脫水處理前，先以 LS 進行滲透壓保護，可使細胞質壁分離 (plasmlysis) 並避免冰晶形成破壞細胞膜結構。而含有高濃度蔗糖的 LS 也能滲透填充於細胞膜間隙及穩定組織結構，從而提高超低溫冷凍保存後之培植體存活率；使用含不同蔗糖濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 及 1.8 M) 的 LS 進行甘藷藻膠球滲透壓保護 3 h，結果含 1.6 M 蔗糖濃度的處理組，其萌生新芽的比率最高達到 80% 以上 (Hirai & Sakai 2003)；在未經 4℃冷馴化培養的馬鈴薯腋芽滲透壓保

護試驗中，則是使用含 0.6 M 蔗糖濃度的 LS 浸漬處理 90 min，最終培植體的存活率也達到 70% 以上 (Hirai & Sakai 1999)。本試驗結果顯示，包埋草莓腋芽培植體的藻膠球，不論是使用含有 0.6 M 蔗糖濃度的處理組或是添加量達到 1.6 M 的處理組，在 25℃的環境下滲透壓保護處理 90 min 後之存活率仍為 100% (資料未列出)。

Wang *et al*. (2005) 研究指出，在藻膠包埋玻璃質化法 (encapsulation-vitrification) 之脫水處理和冷凍保存過程中，應用 PVS2 作為冷凍保護劑，可維持超低溫冷凍保存後之植物細胞活力並避免冰晶產生。由於 PVS2 組成分中含有 15% (w/v) DMSO，其為一種具有高滲透壓及輕微細胞毒性的溶液 (Sakai *et al*. 1990)，因此必需依據冷馴化培養時間、植物種類、供試部位和體積之不同，適當調整脫水處理的時間 (Volk *et al*. 2006)。例如，進行草莓玻璃質化試驗前，先以 10℃低溫冷馴化 30 d，待取得供試培植體後，使用含 0.4 M 蔗糖濃度之 LS 處理 20 min，再以 PVS2 脫水處理 150 min，培植體有高達 97% 的存活率 (Hwang 2007)。本試驗係將不同芽體尺寸 (小於 1 mm 和 1–2 mm) 的草莓腋芽，先使用含蔗糖濃度 1.6 M 的 LS 滲透保護處理 90 min，再使用 PVS2 脫水處理 60 min，經 MS 培養液清洗後，接種在 MS 再生培養基培養 14 d。結果體積小於 1 mm 的腋芽培植體存活率為 60.0% ± 8.2% (圖 2A)，雖顯著高於脫水 120 min、180 min 及 240 min 之處理組 (23.3–43.7%)，但仍低於芽體 1–2 mm 腋芽培植體以 PVS2 脫水處理 60 min 後之存活率 (86.7% ± 4.7%) (圖 2B、圖 3)。不同尺寸的腋芽存活率會產生差異的原因，可能是腋芽生長之節位處，在切取供試材料的過程中，如因腋芽太小，易被解剖刀刃傷害導致組織迅速褐化死亡，當腋芽發育至適當大小，不但易於辨識且在切取時也減少幼嫩組織褐化死亡率，並可提高對 PVS2 溶液的耐受程度，因此適宜作為超低溫冷凍保存的草莓腋芽尺寸應為 1–2 mm。另外，在完成本項試驗後，作者也曾探討縮短 PVS2 脫水時間之可行性，結果以 PVS2 浸漬 0、20 及 40 min 之處理組，腋芽培植體 (芽體尺寸 1–2 mm) 培養 14 d 之存活率皆達到 86.7–100%，雖與浸漬處理 60 min 之處理組 (86.7% ± 4.7%) 無顯著差異，但將其置入液態氮 1 h 後回溫並再生培養後，調查 PVS2 浸漬 0、20 及 40 min 等處理組之存活率，僅分別為 0%、13.3% ± 4.7% 及 46.7% ± 9.4% (資料未列出)。由此得知，培植體在置入液態氮冷凍保存前，比較適當的 PVS2 脫水處理時間仍為 60 min。

目前有關草莓超低溫冷凍保存的研究論文中，探討培植體以液態氮超低溫冷凍前，在抗凍管內加入 PVS2 體積及凍存後回溫時間影響培植體存活率的報導尚不多見。不過，Hwang (2007) 曾研究指出，草莓莖頂在凍存前，先置入抗凍管內並添加 0.5 mL 新鮮的 PVS2，經凍存後取出置入 40℃恆溫水槽中迅速回溫 30 s，可獲得較高的培植體存活率。Hirai *et al*. (1998) 則是在抗凍管內加入 1 mL PVS2，且培植體經凍存後再於 38℃恆溫水槽中回溫。至於作者先前發表的論文 (Shiau & Chen 2014)，則是將草莓莖頂先使用 0.3 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基預培養 14 d，再以含有 1.6 M 蔗糖的 LS 滲透保護 90 min，接著利用 PVS2 浸漬脫水 60 min 後，於凍存前添加 0.3 mL 新鮮的 PVS2，在凍存後取出並置於 38℃的水浴槽中回溫 60 s，可得到 80% 存活率。本試驗結果也顯示，未經冷馴化的草莓腋芽包埋成藻膠球且經過預處理後，在 -196℃液態氮凍存前，可於抗凍管內加入 0.3 mL 的 PVS2 抗凍劑且在凍存後回溫 60–90 s，其培養 14 d 後之存活率可達到 76.6–80% (表 1)。若 PVS2 用量為 1 mL 時，培植體在凍存後回溫的時間則應適度延長為 120 s，雖然各處理組的存活率經比較分析後，彼此間並無顯著差異，但在抗凍管內僅需加入 0.3 mL PVS2 即可達到良好成效且可縮短回溫所需時間，此一結果將有助於減少 PVS2 的使用量。另外，本研究也同時探討液態氮凍存時間對腋芽培植體存活率的影響，結果顯示凍存 1 h、1 d 及 7 d 之培植體存活率約在 73.3–80.0%，凍存時間達 30 d 和 90 d 之培植體存活率同為 66.7%，經比較分析後，彼此間並無顯著差異 (圖 4)。且此種經過超低溫冷

凍保存之腋芽培植體，在繼代培養 7 mo 後，能發育成為根系強健的苗株 (圖 5)。綜合上述各項結果可知，本研究不但得以簡化低溫冷馴化所需的時間及節省空調電力等能源損耗，操作過程中也減少了 PVS2 的用量，故有助於建構自有作物超低溫冷凍保存技術並簡化草莓超低溫冷凍保存的程序。

誌謝

本試驗承農委會科技計畫經費補助 [103 農科-9.2.6-農-C1(2)]，植物超低溫冷凍保存技術則承蒙日本農業生物資源研究所 Takao Niino 博士及島根大學 Toshikazu Matsumoto 博士指導，特此一併申謝。

引用文獻

Ashworth, E. N. and R. S. Pearce. 2002. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species. Planta 214:798–805.

Bajaj, Y. P. S. 1991. Storage and cryopreservation of *in vitro* cultures. p.361–381. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17, High-Tech and Micropropagation I. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer-Verlag. Berlin. 555 pp.

Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: A review. Euphytica 57:227–243.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro* Cell Dev. Biol. Plant 40:427–433.

Hirai, D. and A. Sakai. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. Potato Res. 42:153–160.

Hirai, D and A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. Plant Cell Rep. 21:961–966.

Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai, and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown meristems of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. Euphytica 101:109–115.

Hwang, K. Y. 2007. Investigation of the Protocol on the Cryopreservation of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Treated by Vitrification. Master thesis, Department of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 55 pp. (in Chinese with English abstract)

Keller, E. R., A. Senula, S. Leunufna, and M. Grübe. 2006. Slow growth storage and cryopreservation- tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. Intl. J. Refrig. 29:411–417.

Matsumoto, T., A. Sakai, and Y. Nako. 1998. A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196℃ by vitrification. Cryo. Lett. 19:27–36.

Medina, J. J., I. Clavero-Ramírez, M. E. González-Benito, J. Gálvez-Farfán, J. M. López-Aranda, and C. Soria. 2007. Field performance characterization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) plants derived from cryopreserved apices. Sci. Hort. 113:28–32.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Niino, T. 2006. イチゴ培養茎頂 (ガラス化法). p.53–54. *in*: Cryopreservation of Plant Cell and Organs. (Niino, T., H. Dai, M. Toshikazu, and T. Daisuke, eds.) National Institute of Agrobiological Sciences. Ibaraki. 208 pp. (in Japanese)

Niino, T., D. Tanaka, S. Ichikawa, J. Takano, S. Ivette, K. Shirata, and M. Uemura. 2003. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot tips of strawberry by vitrification. Plant Biotech. 20:75–80.

Ramírez, C., J. M. López-Aranda, J. Gálvez, C. Soria, J. F. Sánchez-Sevilla, J. J. Medina, and M. E. Gónzalez-Benito. 2004. Cryopreservation of *in-vitro* apices of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by a new encapsulation-dehydration method. Acta Hort. 649:115–118.

Reed, B. M., D. Dumet, J. M. Denoma, and E. E. Benson. 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: A pilot study using *Ribes* L. Biodivers. Conserv. 10:939–949.

Rubinstein, B. and M. A. Nagao. 1976. Lateral bud outgrowth and its control by the apex. Bot. Rev. 42:83–109.

Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9:30–33.

Sakila, S., M. B. Ahmed, U. K. Roy, M. K. Biswas, R. Karim, M. A. Razvy, M. Hossain, R. Islam, and A. Hoque. 2007. Micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.): A newly introduced crop in Bangladesh. American-Eurasian J. Sci. Res. 2:151–154.

Shiau, Y. J. and G. W. Chen. 2014. Study on the cryopreservation of non-cold hardening *Fragaria* × *ananassa* Duch. shoot tips. J. Taiwan Agric. Res. 63:57–67. (in Chinese with English abstract)

Shih, J. C., T. F. Hsieh, and C. C. Ho. 2009. Ecological production of strawberry in Taiwan. Acta Hort. 842:397–400.

Suzuki, M., M. Ishikawa, and T. Akihama. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 83:115–121.

Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:571–599.

Tsai, J. H., G. M. Chang, T. Y. Wu, S. C. Peng, H. Y. Chang, and S. J. Chang. 2009. Present status and future prospects of strawberry industry in Taiwan. Acta Hort. 842:623–626.

Volk, G. M., J. L. Harris, and K. E. Rotindo. 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. Cryobiology 52:305–308.

Wang, Q. C., J. Laamanen, M. Uosukainen, and J. P. T. Valkonen. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell Rep. 24:280–288.

Zhao, M., Z. Wang, J. Su, and Y. Qian. 2006. Cryopreservation of *in vitro* cultured shoot tips of strawberry. Acta Hort. 708:265–270.

Study on the Cryopreservation of Non-Cold Hardened *Fragaria* × *ananassa* Duch. Axillary Buds

Yih-Juh Shiau[1,*] and Guan-Wen Chen[2]

Abstract

Shiau, Y. J. and G. W. Chen. 2015. Study on the cryopreservation of non-cold hardened *Fragaria* × *ananassa* Duch. axillary buds. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):228–238.

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) is one of the perennial crops with the high economic value. It belongs to the Rosaceae family and is distributed and cultivated in more than 70 countries. Therefore, the research on long-term storage of strawberry germplasm is important. The major objective of this study is to establish an optimum axillary bud cryopreservation method of non-cold hardened strawberry 'Taoyuan No.1'. The results obtained on pretreatment of axillary buds (bud size: 1–2 mm) prior to plunge into liquid nitrogen (LN) at -196℃ were as follows: (1) The average survival rate of buds was 96.7% ± 5.8% when the buds were precultured on MS basal medium supplemented with 0.3 M sucrose for 14 d; (2) By increasing sucrose level from 0.6 M to 1.6 M in loading solution (LS) and then osmoprotected for 90 min, the survival rate of axillary buds remained 100%; (3) The axillary buds survived was 86.7% ± 4.7% when treated with plant vitrification solution 2 (PVS2) for dehydration for 60 min. This survival percentage was significantly higher compared to PVS2 dehydration treatment for 180 min (46.7% ± 4.7%) and 240 min (46.7% ± 17.0%). After storage in LN, cryotubes were rapidly rewarmed in a water bath at 38℃ for 60−90 s. The survival rates of axillary bud beads in the range of 66.7−80% were achieved after a subculture for 14 d. There were no significant differences in survival percentages of revived axillary buds among the storage duration in LN. These results appear promising for a simplifying cryopreservation method of strawberry axillary buds.

Key words: *Fragaria* × *ananassa* Duch., Cryopreservation, Loading solution, Osmoprotection, Plant vitrification solution 2.

Received: November 6, 2014; Accepted: March 10, 2015.
[*] Corresponding author, e-mail: yjshiau@tari.gov.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 64(3):239–241 (2015)
DOI: 10.6156/JTAR/2015.06403.08 研究簡報

台灣危害木瓜的新興害蟎

何琦琛[1] 王順成[2,*] 黃詩娸[3] 石憲宗[4]

摘要

何琦琛、王順成、黃詩娸、石憲宗。2015。台灣危害木瓜的新興害蟎。台灣農業研究 64(3):239–241。

在屏東縣高樹鄉 3 座網室木瓜園中發現高密度非洲真葉蟎 [*Eutetranychus africanus* (Tucker)] 為害，為主要發生之害蟎；尚有柑桔葉蟎 [*Panonychus citri* (McGregor)] 及葉蟎屬 (*Tetranychus* sp.) 之葉蟎可同時發生，但數量遠低於非洲真葉蟎。非洲真葉蟎第 2 次被報導為害農作物，首度成為作物園中之主要害蟎；它在木瓜園中之普及程度尚待瞭解。文中對不同葉蟎為害方式之區別略做論述。

關鍵詞：木瓜、非洲真葉蟎。

木瓜 (*Carica papaya* Linn.) 葉片受葉蟎為害，常發生至高密度，導至葉片黃化、枯乾、早期脫落，影響所結木瓜之數量、大小、品質，損傷收益。Wen & Lee (1981)、Hao *et al*. (1996) 及 Ho *et al*. (1997) 均曾報導木瓜上的葉蟎種類，彼等調查中以神澤氏葉蟎 (*Tetranychus kanzawai* Kishida) 發生最普遍、其次為柑桔葉蟎 [*Panonychus citri* (McGregor)] 及皮氏葉蟎 (*T. piercei* McGregor)，赤葉蟎 [*T. cinnabarinus* (Boisduval)] 及二點葉蟎 (*T. urticae* Koch) 發生甚少。約在 1996–1997 年時，筆者 (第一作者) 逐漸發現許多網室木瓜園中發生為害的是二點葉蟎，其後二點葉蟎成為筆者在網室木瓜上最常採得之種類。雖有 5 種葉蟎發生於木瓜園為害，但依筆者之經驗，在木瓜上多以 1 種葉蟎為主。然而以上之印象卻在 2014 年之 1 次採集中全被推翻，特報導於下，供植物保護有關同仁及農友參考。

2014 年 4 月前往屏東縣高樹鄉瞭解當地網室木瓜發生之葉蟎種類，造訪菜寮村、大埔村鄰近荖濃溪之 4 座網室木瓜園，檢視園中木瓜葉片，或仍有鉅量葉蟎存在，或是葉蟎數量雖非鉅量，但葉片上之食痕、被害狀及殘留之葉蟎屍體，顯示曾發生極高密度之葉蟎危害。4 園之中，有 1 園之食痕及葉蟎屍體顯示為葉蟎屬 (*Tetranychus*) 之種類為害，另外 3 園皆顯示出不同之特色，園中絕大多數木瓜葉片之葉背及葉面均密布或曾經密布葉蟎，現存之葉蟎主要為非洲真葉蟎 [*Eutetranychus africanus* (Tucker)]，其次為柑桔葉蟎；*Tetranychus* 屬發生很少，1 園採到神澤氏葉蟎、1 園未採到成蟎、1 園未發生。

非洲真葉蟎之卵扁圓盤狀，多沿葉脈產下或產於葉脈附近，密度高後會產在葉脈間之葉表面。雌成蟎亦呈圓盤狀，微扁。雄成蟎體三角形，微扁，足長。各齡期呈現深綠色或近乎褐色，視寄主植物葉色而定，老齡之雄蟎較為黃褐色；木瓜葉上之個體呈暗綠色。依據其體型、體色及棲於葉背，應可憑手持放大鏡予以辨認非洲真葉蟎，與 *Tetranychus* 屬及 *Panonychus* 屬區分。此外，*Tetranychus* 屬葉蟎喜在主葉脈兩側聚居為害，尤其葉脈基部，

投稿日期：2015 年 1 月 6 日；接受日期：2015 年 2 月 12 日。
* 通訊作者：scwang1@cyut.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組前研究員。台灣 台中市。
[2] 朝陽科技大學環境工程與管理學系教授。台灣 台中市。
[3] 朝陽科技大學環境工程與管理學系助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

被害處易黃化、枯乾；但柑桔葉蟎和非洲真葉蟎均不會造成此種症狀，它們較易在葉表散布開來，造成細針刺狀食痕，前者食痕淡色，後者食痕深色。

自 1990 年代末以來，木瓜上之葉蟎逐漸有施用殺蟎劑難以防治之名聲傳播，近些年來尤甚。一般均稱「白蜘蛛」難防治，往常係指綠色之二點葉蟎，以此次調查所見，尤其有二園中仍有輕微農藥味，可能在有些個案中，難防治之木瓜園葉蟎是非洲真葉蟎。若將來之研究證實此點，國外雖早有 *Eutetranychus* 屬葉蟎對殺蟎劑產生耐藥性之問題，在台灣仍屬首次出現之狀況。

真葉蟎通常在植物葉片之葉面棲息，密度過高時，也會在葉背發現少量個體或微小棲群。前述 3 園之木瓜葉片在葉面上，均密布非洲真葉蟎各齡期之活體及屍體，屍體多之葉片依然有為數不少之活體。柑桔葉蟎通常亦在葉面棲息，前述 3 木瓜園中，因為大量發生非洲真葉蟎，柑桔葉蟎大肆出現於葉背。

過去台灣所記錄之真葉蟎為東方真葉蟎 [*Eu. orientalis* (Klein)]，筆者在東勢梨園採到之真葉蟎依 Meyer (1987) 之描述及檢索表鑑定為非洲真葉蟎 (Ho *et al*. 2013)，是為該蟎在台灣之首次記錄。此次為非洲真葉蟎在台灣為害農作物之第 2 次報導，亦為第 2 種被害農作物，不同的是：它在梨上僅偶而少量發生，但本次所見為高密度發生之最主要種類。筆者在 1990 年代後期亦曾在鄰近山區家屋附近之零星木瓜植株上發現真葉蟎為主要發生害蟎，當時以東方真葉蟎視之，以此次網室木瓜中之發生看來，彼時所發現者極有可能是非洲真葉蟎。斯時木瓜園 (含網室木瓜) 中主要發生者仍為 *Tetranychus* 屬種類，而今卻已有木瓜園中主要發生 *Eutetranychus* 屬種類，非洲真葉蟎在網室木瓜園中是否普遍發生？尚請第一線植保工作人員累積資訊。

引用文獻

Hao, H. H., H. L. Wang, W. T. Lee, and K. C. Lo. 1996. Studies on biological control of spider mites on papaya. J. Agric. Res. China 45:411–421. (in Chinese with English abstract)

Ho, C. C., K. C. Lo, and W. H. Chen. 1997. Spider mite (Acari: Tetranychidae) on various crops in Taiwan. J. Agric. Res. China 46:333−346. (in Chinese with English abstract)

Ho, C. C., M. Y. Lin, S. H. Liang, and S. C. Wang. 2013. New members of the spider mite fauna in mango and pear orchards. Formosan Entomol. 33:57–66. (in Chinese with English abstract)

Meyer, M. K. P. 1987. African tetranychidae (Acari: Prostigmata) with reference to the world genera. Entomol. Mem. Dept. Agric. Wat. Supp. Repub. South Africa 69:1–175.

Wen, H. C. and H. S. Lee. 1981. Seasonal occurrence and chemical control of the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisduval) on papaya. Plant Prot. Bull. 23:131–135. (in Chinese with English abstract)

Newly Boomed Mite Pest of Papaya in Taiwan

Chyi-Chen Ho[1], Shun-Cheng Wang[2,*], Shih-Ying Huang[3], and Hsien-Tzung Shih[4]

Abstract

Ho, C. C., S. C. Wang, S. Y. Huang, and H. T. Shih. 2015. Newly boomed mite pest of papaya in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):239–241.

Eutetranychus africanus (Tucker) population of very high density was found to be the key pest in three screen-housed-papaya orchards in Gaoshu, Pintung County. *Panonychus citri* (McGregor) and *Tetranychus* sp. may occur simultaneously in much smaller population. This is the second time that *Eu. africanus* was reported as crop pest in Taiwan and the first time to be a key pest. More information is needed to understand the popularity of this mite in papaya orchards. The recognition of the different spider mite genera on papaya by the shape, habitat, and color was described concisely.

Key words: Papaya, *Eutetranychus africanus*.

Received: January 6, 2015; Accepted: February 12, 2015.

* Corresponding author, e-mail: scwang1@cyut.edu.tw

1 Former Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Professor, Department of Environmental Engineering and Management, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.

3 Assistant, Department of Environmental Engineering and Management, Chaoyang University of Technology, Taichung, Taiwan, ROC.

4 Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Phathology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Lee, Miao-Jyun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 64 No. 3 September 30, 2015

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/JTAR
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.64 No.3 2015

Review Article

167 Role of Glutathione in Abiotic Stress Tolerance of Rice Plants
Ching Huei Kao

Research Articles

177 *In Vitro* Seed Germination and Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* Libosch
Chin-Yi Tsao, Uei-Chern Chen, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia

189 A Study on Heat Pump Condensation Drying System
Li-Duhng Huarng, Jian-Jhih Lin, Hsiang-Wen Chiu, and Jyh-Rong Tsay

196 A Study on Microwave Condensation Drying of Shiitake Mushroom
Li-Duhng Huarng, Jian-Jhih Lin, and Hsiang-Wen Chiu

204 Evaluation of a TaqMan One-Step Real-Time RT-PCR Method for the Detection of CCYV
Cheng-Ping Kuan, Yu-Chang Lin, Ching-Shan Tseng, Ying-Huey Cheng, and Ting-Ching Deng

213 Using Importance-Performance Analysis to Evaluate the Effectiveness of the Interpretive Media in Taiwan Agricultural Research Institute
Shu-Fen Shiau, Yu-Shih Hsieh, and Lit-Fu Chan

228 Study on the Cryopreservation of Non-Cold Hardened *Fragaria × ananassa* Duch. Axillary Buds
Yih-Juh Shiau and Guan-Wen Chen

Short Communication

239 Newly Boomed Mite Pest of Papaya in Taiwan
Chyi-Chen Ho, Shun-Cheng Wang, Shih-Ying Huang, and Hsien-Tzung Shih

ISSN 0022-4847

9770022484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture